



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Preparação e caracterização de micropartículas de polissacáridos para libertação controlada de fármacos anticancerígenos no cólon

Ana Margarida Dias Figueiredo

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora- Professora Doutora Margarida Cardoso

Júri

Presidente – Professor Doutor José Paulo Mota

Arguente – Professor Doutor Vítor Alves

Orientadora – Professora Doutora Margarida Cardoso

Fevereiro de 2011

Direitos de cópia

Preparação e caracterização de micropartículas de polissacáridos para libertação controlada de fármacos anticancerígenos no cólon.

Copyright © 2011- Ana Margarida Dias Figueiredo - FCT/UNL - UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Todos os excertos e imagens retirados de diversos artigos, presentes ao longo desta dissertação são reproduzidos sob a permissão dos editores originais e sujeitos às restrições de cópia impostos pelos mesmos. À restante dissertação aplica-se a indicação de direitos de autor em nome de Ana Margarida Dias Figueiredo, FCT/UNL e UNL.

Agradecimentos

Após um grande período de trabalho, que exigiu um grande esforço e bastante persistência, consigo completar esta etapa que me conduz ao final do curso de Engenharia Química e Bioquímica.

Durante este período tive o privilégio de poder contar com a colaboração de um conjunto de pessoas, às quais gostaria expressar toda a minha gratidão.

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Cardoso, agradeço, não só por esta oportunidade de trabalhar em algo que sempre me fascinou, mas também por todo o tempo que me dispensou. Muitos foram os conhecimentos que me foram transmitidos e que permitiram o meu desenvolvimento.

Ao Doutor Vítor Alves, não apenas por todos os conhecimentos que me transmitiu acerca de vários aspectos deste trabalho, mas também por ter tornado possível a realização de experiências no “Spray Dryer”.

À Doutora Filomena Freitas, agradeço a disponibilidade para o esclarecimento das dúvidas respeitantes ao polissacárido extracelular, assim como toda a informação disponibilizada.

Ao Professor Doutor Joaquim Vital, por toda a sua ajuda e conhecimento que me transmitiu.

À Professora Doutora Isabel Fonseca, por toda a sua ajuda no que diz respeito à interpretação dos resultados obtidos pelo ASAP.

À Dona Palminha, por toda a sua simpatia, disponibilidade e ajuda em termos técnicos.

À Inês Peça, não só por toda a paciência, a ajuda a nível laboratorial e por todos os conhecimentos que me transmitiu, mas também por toda a sua amizade e por todo o apoio que me deu quando as dificuldades surgiam.

À minha família e à família Nogueira, por todo o esforço que fizeram para que eu conseguisse terminar esta etapa, por terem sido o meu apoio e por sempre terem acreditado em mim.

A todos os meus amigos, em especial à Susete Fernandes, Muna Sidarus, Marina Guerreiro e Ana Filipa Miguel, por toda a ajuda que me prestaram e por toda a amizade, estando sempre lá quando precisei.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao André Nogueira, que esteve comigo nos bons e maus momentos, sempre com um sorriso.

Tenho noção que, sem a ajuda preciosa destas pessoas, isto nunca teria sido possível e, por isso deixo a todos um grande muito obrigada!

Sumário

Neste trabalho produziram-se micropartículas de exopolissacárido (EPS) e goma de guar (GG) contendo Tegafur. Foram caracterizadas na sua morfologia, tamanho, composição, capacidade de absorção de água, porosidade e encapsulação do fármaco.

Foram produzidas micropartículas de EPS pelo método de emulsificação, com auto-reticulação por ácido sulfúrico, que não apresentaram integridade em meio básico.

Produziram-se microsferas de EPS e GG utilizando o “Spray Dryer” mas o baixo rendimento obtido tornou o processo inviável.

Produziram-se micropartículas de GG pelo método de precipitação, utilizando o planeamento de experiências do composto central. As variáveis independentes consideradas foram a concentração de GG, o volume de glutaraldeído e o tempo de reticulação sendo o volume de glutaraldeído o que mostrou maior influência no processo de reticulação. A escolha de limites reduzidos para estas duas últimas variáveis impossibilitou a optimização do processo.

Verificou-se que a eficiência de encapsulação do fármaco foi baixa. Por estudos efectuados ao processo concluiu-se que a perda do fármaco ocorre maioritariamente no processo de precipitação.

Realizaram-se experiências em que macropartículas vazias produzidas pelo método de precipitação foram colocadas numa solução concentrada de 5-FU e Tegafur. Verificou-se um aumento da eficiência de encapsulação e uma maior encapsulação do 5-FU comparativamente ao Tegafur.

Termos Chave: Sistemas de libertação controlada de fármacos, Cólon, Micropartículas de Goma de Guar e EPS, Tegafur e 5-Fluorouracil, Reticulação, método do Composto Central.

Abstract

In the present work exopolysaccharide (EPS) and guar gum (GG) microparticles were produced and characterized by their shape, surface morphology, size, chemical composition, swelling, porosity and encapsulation efficiency.

EPS microparticles were produced through the emulsification method using sulfuric acid as a cross-linking agent. The obtained microparticles dissolve rapidly in basic medium.

EPS and GG microspheres were produced by Spray Drying. The low efficiency, however, makes this process impracticable.

GG microparticles were produced through the precipitation method and a central composite design was used to create and perform several experiments. The analysed factors were GG concentration, cross-linker volume, and cross-linking time, with the cross-linker volume showing a greater influence in the cross-linking process. The choice of reduced limits for the cross-linker volume and cross-linking time prevented us from being able to optimize the process.

It was found that the drug encapsulation efficiency was low. The process was studied and it was concluded that the loss of drug occurs at the stage that precedes Ultra-Turrax's.

Experiments were performed in which empty microparticles, produced through the precipitation method, were placed in a concentrated solution of 5-FU and Tegafur. There was an increase of encapsulation efficiency, with 5-FU achieving greater encapsulation than Tegafur.

Keywords: Controlled Drug Release Systems, Colon, Guar Gum and EPS microparticles, Tegafur and 5-Fluorouracil, Cross-linking, Central Composite Design.

Índices

Direitos de cópia	I
Agradecimentos.....	III
Sumário	V
Abstract	VII
Índices	IX
Índice de Matérias	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas.....	XV
Lista de símbolos e abreviaturas	XVII

Índice de Matérias

1.	Introdução	1
2.	Revisão Bibliográfica	7
2.1.	Polímeros biodegradáveis em sistemas de libertação controlada	8
2.1.1.	EPS	10
2.1.2.	Goma de guar	10
2.1.3.	Reticulação de polissacáridos	11
2.2.	Mecanismos de libertação controlada	14
2.2.1.	Mecanismo de libertação por difusão	14
2.2.2.	Mecanismo de libertação por inchamento da estrutura polimérica	14
2.2.3.	Mecanismo de libertação por degradação química	15
2.3.	Cinéticas de libertação	16
2.4.	Métodos de produção de micropartículas	18
2.4.1.	Método de emulsificação	18
2.4.2.	“Spray Drying”	18
2.4.3.	Método de precipitação	19
2.4.4.	Outros métodos correntemente utilizados	19
2.5.	Factores que influenciam a libertação do princípio activo	19
2.6.	Fármacos modelo: 5-Fluorouracil e Tegafur	20
3.	Materiais e Métodos	23
3.1.	Materiais	23
3.2.	Métodos	23
3.2.1.	Preparação das micropartículas	23
3.2.2.	Caracterização das micropartículas	26
3.2.2.1.	Morfologia externa das micropartículas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	26
3.2.2.2.	Eficiência de Encapsulação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	26
3.2.2.3.	Determinação da composição das micropartículas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	27
3.2.2.4.	Estudos de capacidade de absorção de água	27
3.2.2.5.	Medidas de porosidade por ASAP	28
3.2.3.	Ensaio de Libertação	28
4.	Resultados e Discussão	29
4.1.	Micropartículas de EPS	29

4.1.1.	Método por emulsificação	29
4.1.1.1.	Caracterização morfológica.....	29
4.1.1.2.	Ensaio de dissolução	34
4.1.2.	“Spray Dryer”.....	35
4.1.3.	Método de precipitação	36
4.2.	Micropartículas de goma de guar	36
4.2.1.	“Spray Dryer”.....	36
4.2.2.	Método de precipitação	37
4.2.2.1.	Experiências preliminares	37
4.2.3.	Planeamento de Experiências.....	37
4.2.3.1.	Caracterização morfológica.....	39
4.2.3.2.	Medidas de porosidade	53
4.2.3.3.	Estudos de capacidade de absorção de água.....	54
4.2.3.4.	Estrutura química das micropartículas	58
4.2.3.5.	Ensaio de Libertação.....	61
4.2.4.	Determinação da perda de princípio activo no processo de produção.....	63
4.2.5.	Produção de macropartículas.....	64
5.	Conclusões	69
5.1.	Micropartículas de EPS	69
5.2.	Micropartículas de Goma de Guar	69
6.	Trabalho futuro.....	73
7.	Bibliografia.....	75

Índice de Figuras

Figura 1. 1- Cinco cancros com o maior número de novos casos no mundo, em 2010. ^[15]	3
Figura 1. 2- Cinco cancros com maior mortalidade no mundo, em 2010. ^[15]	4
Figura 1. 3- Cinco cancros com o maior número de novos casos em Portugal, em 2010. ^[15]	4
Figura 1. 4- Cinco cancros com maior mortalidade em Portugal, em 2010. ^[15]	5
Figura 2. 1- Esquema do sistema do tipo reservatório (A) e sistema do tipo matriz polimérica (B). ^[19]	8
Figura 2. 2 - Imagem da planta que dá origem à goma de guar, <i>Cyamopsis Tetragonolobus</i> . ^[39]	10
Figura 2. 3 - Estrutura química da goma de guar. ^[41]	11
Figura 2. 4 - Esquema da reacção da divinilsulfona com grupos hidróxilo. ^[46]	12
Figura 2. 5 - Esquema da reacção do glutaraldeído com grupos hidróxilo. ^[46]	12
Figura 2. 7 - Esquema da reacção do 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. ^[46]	13
Figura 2. 6 - Esquema da reacção do poli(etileno glicol) diglicidil éter com grupos hidróxilo. ^[46] ..	13
Figura 2. 8 - Esquema de libertação por difusão. ^[19]	14
Figura 2. 9 - Esquema de libertação por inchamento da estrutura polimérica ^[19]	15
Figura 2. 10 - Esquema do mecanismo de libertação por degradação superficial da estrutura polimérica. ^[19]	16
Figura 2. 11 - Esquema do mecanismo de libertação por degradação estrutural do polímero. ^[19] ...	16
Figura 2. 12 - Representação gráfica das cinéticas de libertação. ^[16]	17
Figura 2. 13 – Estrutura química da molécula de 5-Fluorouracil. ^[55]	21
Figura 2. 14 - Estrutura química do Tegafur. ^[55]	21
Figura 3. 1 - Representação gráfica do desenho de experiências do composto central, para três variáveis independentes. ^[59]	25
Figura 4. 1 - Micropartículas de EPS auto-reticuladas com ácido sulfúrico concentrado.....	30
Figura 4. 2 - Micropartículas de EPS, reticuladas com divinilsulfona.	30
Figura 4. 3 – Micropartículas de EPS, reticuladas com EDC.	31
Figura 4. 4 - Experiência de produção de micropartículas de EPS reticuladas com etileno glicol diglicidil éter.	31
Figura 4. 5 – Micropartículas de EPS, auto-reticuladas com ácido sulfúrico concentrado, com as alterações ao protocolo experimental.	33
Figura 4. 6 – Micropartículas de EPS, reticuladas com divinilsulfona, com as alterações ao protocolo experimental.....	33
Figura 4. 7 - Micropartículas de EPS obtidas por “Spray Drying”.	35
Figura 4. 8 - Micropartículas de goma de guar obtidas por “Spray Drying”.	36
Figura 4. 9 - A - Macropartículas; B- Micropartículas.....	37
Figura 4. 10 - Resultados obtidos pela experiência 1.....	39
Figura 4. 11 - Resultados obtidos pela experiência 2.....	40
Figura 4. 12 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 3.	40
Figura 4. 13 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 4.	41
Figura 4. 14 - Resultados obtidos pela experiência 5.....	41
Figura 4. 15- Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 6.	42
Figura 4. 16 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 7.	43
Figura 4. 17 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 8.	44
Figura 4. 18 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 9.	45

Figura 4. 19 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 10. ..	45
Figura 4. 20 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 11. ..	45
Figura 4. 21 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 12. ..	46
Figura 4. 22 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 13. ..	47
Figura 4. 23 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 14. ..	47
Figura 4. 24 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 15. ..	48
Figura 4. 25 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 16. ..	49
Figura 4. 26 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 17. ..	50
Figura 4. 27- Isotérmicas de adsorção e dessorção: A - Experiência 10; B - Experiência 19.	54
Figura 4. 28 - Variação do grau de absorção de água com a variação do volume de agente reticulante adicionado.....	57
Figura 4. 29 - Espectro de FT-IR da goma de guar.	58
Figura 4. 30 – Espectro de FT-IR do Tegafur.	59
Figura 4. 31 - Espectro de FTIR das micropartículas obtidas pela experiência 9 (A) e 11 (B).....	60
Figura 4. 32 - Espectros de FT-IR das micropartículas obtidas pela experiência 12 (A) e 13 (B)...	60
Figura 4. 33 - Espectros de FT-IR das micropartículas obtidas pela experiência 14 (A), 15 (B) e 19 (C).....	61
Figura 4. 34 – Perfis de liberação obtidos pela experiência 8.	63
Figura 4. 35 - Perfis de liberação das macropartículas obtidas pela experiência 20	65
Figura 4. 36 - Perfis de liberação das macropartículas obtidas pela experiência 21	65
Figura 4. 37 -Perfis de liberação das macropartículas obtidas pela experiência 22	66

Índice de Tabelas

Tabela 2. 1- Estratégias utilizadas para a libertação de princípios activos no cólon.....	9
Tabela 2. 2- Princípios activos utilizados em sistemas de libertação no cólon, constituídos por goma de guar, e respectivas referências.	11
Tabela 2. 3 - Métodos de produção de micropartículas correntemente utilizados, e respectivas referências.	19
Tabela 4. 1 - Limites das variáveis independentes.	38
Tabela 4. 2 - Experiências realizadas e respectivas condições.....	38
Tabela 4. 3- Intervalos e valores médios dos tamanhos das micropartículas do planeamento de experiências.....	51
Tabela 4. 4 – Área superficial e volume total dos poros das micropartículas obtidas pelas experiências.....	53
Tabela 4. 5 - Parâmetros de produção das micropartículas e respectivos graus de absorção de água.	55
Tabela 4. 6 - Massa de princípio activo libertada em meio ácido e PBS, nas micropartículas do planeamento de experiências.....	62
Tabela 4. 7 - Experiências para determinar a origem da perda de princípio activo no processo de produção.....	63
Tabela 4. 8 - Eficiência de encapsulação nas experiências 18.1, 18.2, 18.3 e 18.4.....	64

Lista de símbolos e abreviaturas

OMS	Organização Mundial de Saúde
FDA	Us Food and Drug Organization
EPS	Exopolissacárido produzido pela bactéria <i>Enterobacter sp. A47 DSM 23139</i>
GG	Goma de Guar
DVS	Divinilsulfona
GA	Glutaraldeído
EDC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
5-FU	5-Fluorouracil
DDP	Dihidropirimidina desidrogenase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
PBS	Tampão fosfato salino
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
SEM	Microscópio electrónico de varrimento

1. Introdução

Desde sempre, a medicina reuniu esforços no que diz respeito ao desenvolvimento de métodos de prevenção e tratamento de doenças eficazes. Actualmente, muitas das doenças que se pensavam incuráveis ou impossíveis de prever, já não o são.

Muito desenvolvimento tem sido efectuado nas áreas da saúde e cada vez mais há a preocupação, não só com a prevenção e combate da doença, mas também com o bem-estar do paciente no decorrer do processo de tratamento.

Um dos grandes alvos da forte investigação em áreas de medicina são os sistemas de libertação controlada de princípios activos. Devido às vantagens destes sistemas relativamente aos métodos convencionais, os mesmos têm sido bastante desenvolvidos e já têm um grande número de aplicações. Estes sistemas constituem um desafio para a medicina. (Breimer 1999)

O grande objectivo dos sistemas de libertação controlada é manter uma concentração terapêutica de princípio activo no sangue e tecidos ou células alvo, o máximo de tempo possível (Grassi, 1996; Langer and Wise, 1984; Pillai *et al.*, 2001), sendo isto possível através do desenho de sistemas com uma cinética de libertação adequada. Estes sistemas poderão ser administrados por várias vias, como oral, intravenosa, nasal, pulmonar, entre outras,^[1] e os princípios activos e formas de acção poderão ser podem ser analgésicos, proteínas, péptidos, antibióticos, enzimas, agentes utilizados em quimioterapia, vitaminas, esteróides, bactérias, vírus e antisépticos.^[2] Um trabalho conjunto de áreas como a biologia, farmácia, química, física e medicina tem permitido desenvolvimentos rápidos e consistentes nos sistemas de libertação controlada.^[3]

Estes sistemas apresentam vantagens, não só favoráveis às áreas da saúde, mas também a áreas como a biotecnologia, agricultura, indústria alimentar, entre outras.^[2]

Os sistemas de libertação controlada apresentam muitas vantagens, (Rubinstein, 1990) que são apresentadas em seguida:

- Protecção do princípio activo dos locais onde possa ser degradado, mantendo-o na sua forma intacta até atingir o local de libertação e reduzindo as perdas;
- Libertação do princípio activo directamente no seu local de acção, o que permite uma redução na dose, causando não só uma redução nas reacções adversas, que são a maior limitação do tratamento nestas condições, (Basit 2005) como tornando o processo mais económico;
- A concentração do princípio activo é mantida constante no local desejado e há um maior contacto com os tecidos e células doentes, o que potencia um tratamento mais eficaz;
- Uma grande flexibilidade, o que permite a estes sistemas serem utilizados no tratamento de muitas doenças, em vários locais do organismo. Estes sistemas podem libertar um grande número de diferentes princípios activos e utilizar diversos materiais que lhes permitirão adaptar-se a diferentes ambientes existentes no interior do organismo;
- A cinética de libertação do princípio activo pode ser adaptada às necessidades do paciente, tornando estes sistemas mais seguros;
- Aumento do tempo de vida do princípio activo no organismo.

Estes sistemas já são aplicados na libertação de princípios activos em doenças oculares, contracepção, doenças imunológicas, cancro, diabetes, entre outros.^[2] Mais recentemente, foram desenvolvidos sistemas para libertação controlada de vacinas e de DNA.^[1]

Uma das localizações mais interessantes e vantajosas para a aplicação destes sistemas é o cólon, visto que doenças como o cancro colo-rectal, doença de Crohn, colite ulcerativa e síndrome do intestino irritável teriam um tratamento mais eficiente caso os princípios activos fossem libertados directamente no cólon. (Milojevic, S. *et al.*, 1996) Além disto, a libertação de princípios activos neste local apresenta bastantes vantagens, uma vez que:

- Permite a absorção de fármacos, proteínas e péptidos que são instáveis no estômago e intestino delgado (Orienti, I. *et al.*, 2001, Sinha, V. C. *et al.*, 2001, Stubbe, B. *et al.*, 2001, Yang, L. *et al.*, 2002, Yoshikawa, Y. *et al.*, 1999) devido à sua degradação pela actividade enzimática nesses locais (Ghandehari, H. *et al.*, 1995);
- O seu tecido tem uma maior exposição aos princípios activos do que a circulação sistémica obtida com outros modos de administração (Tozler, T., 1990),
- O grande tempo de residência no cólon facilita o processo de absorção ou acção do princípio activo, uma vez que o material poderá ficar no cólon cerca de 24h, em contraste com as 3h que poderá passar no intestino delgado (Basit 2005);
- Embora apresente uma muito menor área de absorção, comparativamente ao intestino delgado (1,3 m² para 200 m², respectivamente) (Faigle 1993), possibilita uma absorção na corrente sanguínea e no sistema linfático;
- Beneficia o tratamento de certas doenças com a libertação de compostos de reduzidos pesos moleculares (Minko, 2004; Jain *et al.*, 2006; Mladenovska *et al.*, 2007 a,b; Anande *et al.*, 2008; Jain and Jain, 2008; Simonoska Crcarevska *et al.*, 2008);
- Tem uma actividade enzimática específica, devido às bactérias anaeróbias e tem um pH superior ao de outras partes do tracto gastro-intestinal (Rubinstein, A. *et al.*, 1992);
- Possui bastante tecido linfático, o que facilita a absorção dos compostos para o sangue e uma menor actividade proteolítica quando comparado com o intestino delgado (Sarsija and Hota 2000; Lee 1991; Ikesue, Kopeckova e Kopecek 1991)

Muitas são as razões que justificam a utilização de sistemas de libertação controlada de princípios activos no cólon. Além das vantagens anteriormente referidas, a reduzida eficácia dos métodos comuns, como as formas orais convencionais, a administração intravenosa e a administração rectal, fazem com que seja necessário o desenvolvimento de um método mais eficaz.

As formas orais convencionais têm-se mostrado ineficazes, uma vez que não protegem o princípio activo no estômago e intestino delgado, sendo o mesmo absorvido ou degradado nesses locais, dando origem a efeitos adversos, perdas de princípio activo e, consequentemente, uma terapêutica menos eficaz.^{[4][5]}

A administração por via intravenosa é um método bastante doloroso; inseguro, uma vez que a utilização de cateteres poderá originar infecções; caro, inconveniente para os pacientes; grande parte do agente terapeutico não atinge o local desejado, o que provoca reacções adversas e é requerida uma maior dose para compensar as perdas e se atingir uma quantidade terapeuticamente eficaz.^{[6][7][8]}

Numa investigação coordenada por Liu *et al.*, foi elaborado um questionário de modo a averiguar a preferência dos pacientes, no que diz respeito ao modo de administração da quimioterapia: via oral ou intravenosa. Como resultados das respostas de 103 pacientes, 92 afirmaram preferir a quimioterapia administrada oralmente por razões como uma maior conveniência; mais conforto, visto deixarem de ser necessárias visitas ao hospital para a quimioterapia; e problemas originados por infecções.^[9]

A administração rectal pode ser efectuada utilizando dispositivos como supositórios e enemas e apresenta vantagens tais como a formulação ter um menor percurso a percorrer ou o princípio activo não ser perdido no estômago ou intestino delgado. No entanto, não é um método de administração aceite pelos pacientes nem é um método que é sempre eficaz, uma vez que uma grande variabilidade na distribuição do princípio activo é observada (Wood *et al.*, 1985). Os supositórios só são eficientes no recto (Jay *et al.*, 1985), enquanto que os enemas apenas têm a capacidade de ter uma acção terapêutica no sigmóide e cólon descendente. (Hardy, 1989)^{[10][11]}

O cancro colo-rectal, uma das doenças cujo tratamento efectuado directamente nas células doentes seria bastante benéfico, é uma neoplasia maligna do cólon e/ou recto. Inicia-se em células do

cólon/recto e, em estados mais avançados, as células cancerosas propagam-se para os nódulos linfáticos e, mais tarde, para outros órgãos, principalmente para o fígado.

Muitos são os factores de risco para o aparecimento desta doença, tais como a idade; a presença de pólipos no cólon e recto, que são pequenas saliências presentes no cólon e recto e que se podem tornar cancerígenas; incidência hereditária da doença; alterações genéticas; historial de doenças que causam irritação no cólon, como a doença de Crohn; alimentação desequilibrada, pobre em fibras, cálcio e folato e rica em gordura; sedentarismo; obesidade; tabagismo e consumo de álcool.^[12]

O cancro colo-rectal pode ser prevenido adoptando um estilo de vida saudável e recorrendo a métodos de prevenção, tais como a colonoscopia ou a detecção de anomalias no DNA fecal.^[13] As formas mais comuns para o tratamento do cancro colo-rectal são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia.^[7] Embora este tipo de cancro seja removido com sucesso por cirurgia, em cerca de 50%-60% dos pacientes, as células cancerosas já se propagaram a outros órgãos, dando origem às chamadas metástases.^[14]

Segundo os dados obtidos pelo programa *Globocan*, um programa da Organização Mundial da Saúde (OMS) que permite estimar os números de novos casos e mortalidade, para vários tipos de cancro, de 2008 a 2030^[15], prevê-se que o cancro colo-rectal seja o terceiro cancro com o maior número de novos casos e o quarto com uma maior mortalidade, tal como se pode verificar nas figuras 1.1 e 1.2.

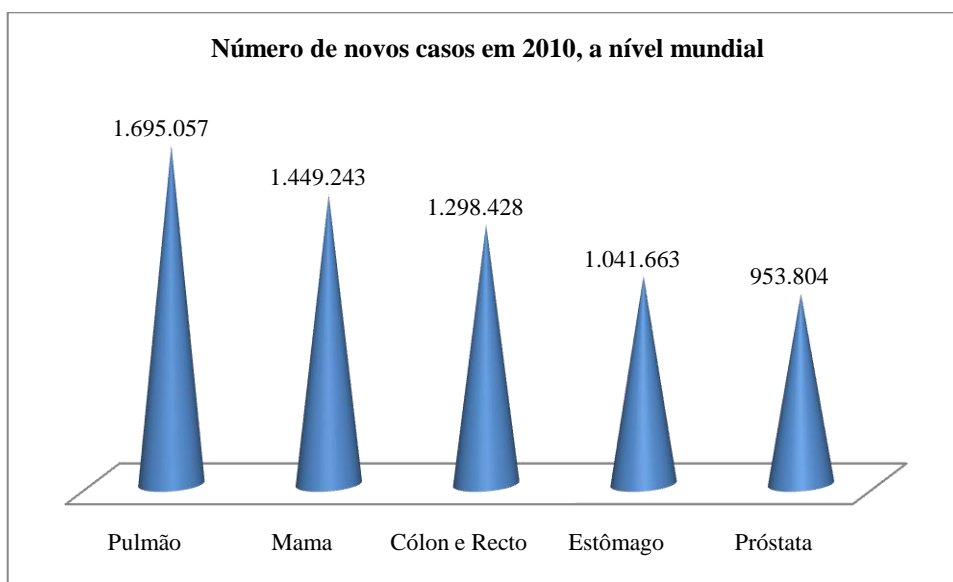


Figura 1. 1- Cinco cancros com o maior número de novos casos no mundo, em 2010.^[15]

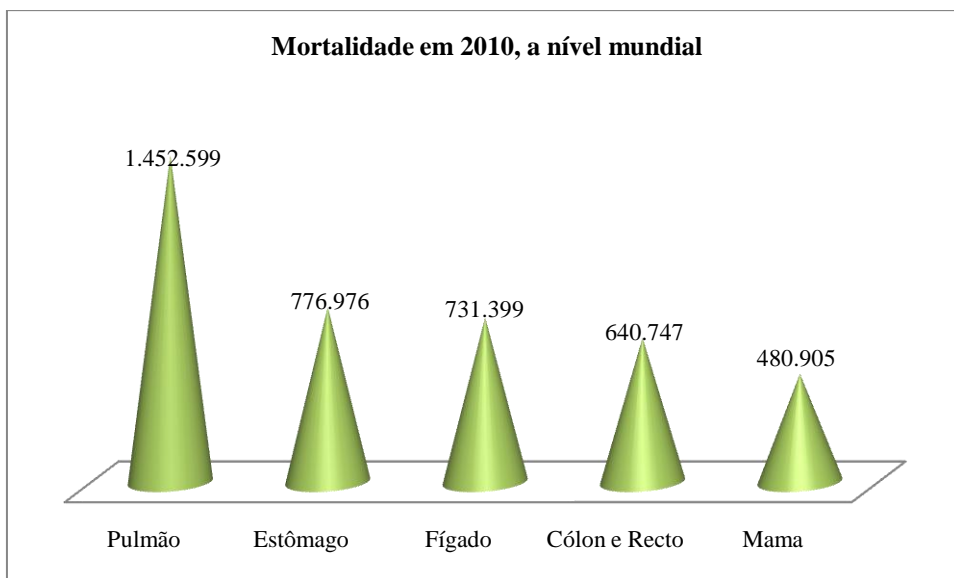


Figura 1. 2- Cinco cancros com maior mortalidade no mundo, em 2010.^[15]

De acordo com as previsões efectuadas pelo programa *Globocan*, tanto a incidência como a mortalidade por cancro colo-rectal tendem a aumentar, sendo que em 2020 estão previstos mais 1.682.843 novos casos e 830.401 mortes e em 2030, são esperados 2.188.194 novos casos e 1.098.419 mortes.

No que diz respeito à situação do cancro colo-rectal em Portugal, as previsões apontam para que este seja o cancro com o maior número de novos casos e mortalidade, à frente de cancros como o do estômago e pulmão, tal como se pode observar nas figuras 1.3 e 1.4.

No que diz respeito a tendências futuras, tal como acontece a nível mundial, o cancro colo-rectal está previsto aumentar para 8.178 novos casos e 4.376 mortes em 2020 e para 9.333 novos casos e 5.078 mortes em 2030.

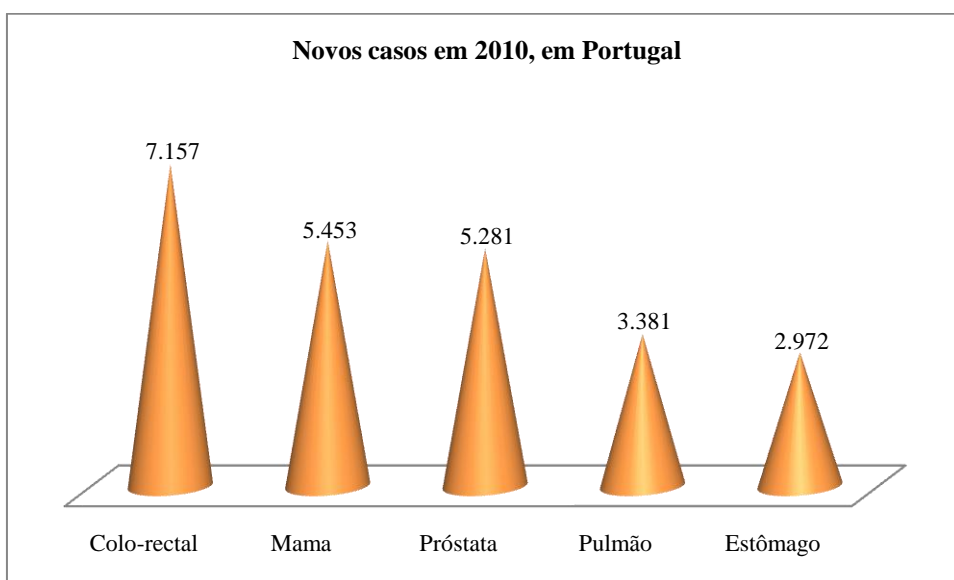


Figura 1. 3- Cinco cancros com o maior número de novos casos em Portugal, em 2010.^[15]

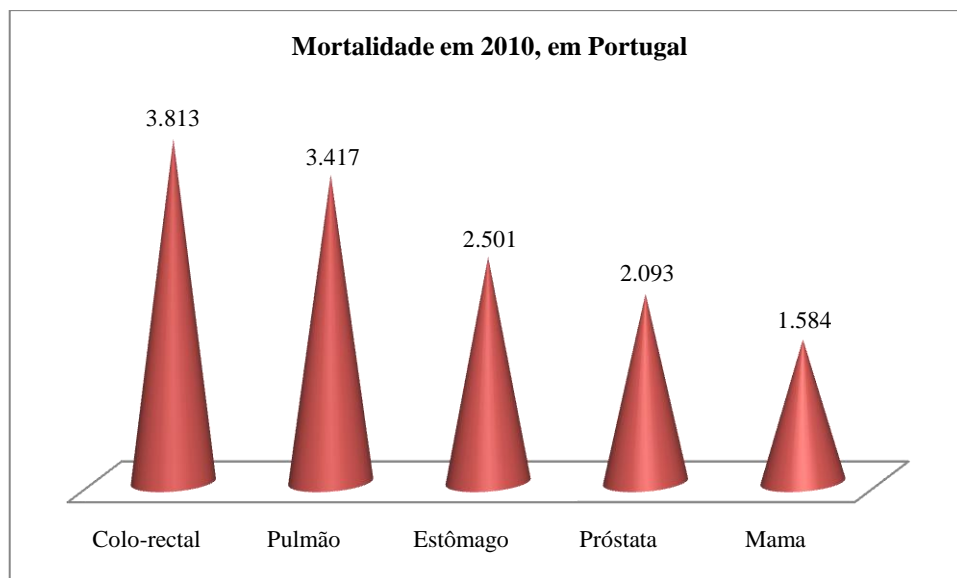


Figura 1. 4- Cinco cancros com maior mortalidade em Portugal, em 2010.^[15]

2. Revisão Bibliográfica

A necessidade de um tratamento eficiente para o cancro do cólon impulsionou a criação de sistemas de libertação controlada de fármacos anticancerígenos neste local. Como foi referido anteriormente, os métodos de administração mais comuns não são eficazes, podendo resultar em complicações adicionais. Assim, muitos sistemas, compreendendo uma vasta diversidade de fármacos e de materiais que os transportam até ao cólon e aí permitam a sua libertação foram estudados e desenvolvidos.

Como resultado de uma forte investigação nesta área, diversas formulações, como comprimidos revestidos, cápsulas, pellets, matrizes poliméricas revestidas, micropartículas, lipossomas, grânulos, entre outros, foram reportadas.^{[16][17]}

Algumas dessas formulações, como os comprimidos revestidos, cápsulas, pellets e matrizes poliméricas revestidas apresentam a desvantagem de, devido às suas dimensões, o seu tempo de residência no intestino grosso não ser suficiente para se dar uma desintegração completa e, portanto, a formulação é eliminada com parte do agente activo. Consequentemente, uma concentração terapêutica de princípio activo nas células tumorais não é atingida, tornando o tratamento pouco eficaz.

Então, é necessário aumentar o tempo de retenção destes sistemas no cólon, de modo a poder haver uma libertação completa. Uma diminuição no tamanho das formulações poderá ser uma solução para contornar este inconveniente e, então, as micropartículas são uma boa alternativa a estes sistemas, uma vez que apresentam pequenas dimensões, entre 1 e 1000 μm .^[3]

As micropartículas apresentam diversas vantagens, pois podem proteger os princípios activos do ambiente adverso do tracto gastrointestinal e têm um maior interesse para sistemas de libertação por administração oral pelo seu pequeno tamanho e elevada área superficial, que favorece a sua absorção, comparativamente a partículas de maiores dimensões (Silva et al., 2006). Além disto, partículas de menores dimensões terão um maior tempo de residência no cólon, contornando o problema da desintegração incompleta de partículas de maiores dimensões.^[7]

Para sistemas de libertação controlada, as micropartículas podem ser pellets, microcápsulas, microesferas ou lipoesferas, podendo ser constituídas por materiais como polímeros, proteínas ou lípidos.^[16]

As estruturas das micropartículas podem ser do tipo reservatório ou do tipo matriz, sendo cada um destes sistemas descrito em seguida:

- Sistema reservatório, representado na figura 2.1-A, no qual um núcleo contendo o princípio activo está rodeado por uma membrana que controla a velocidade de libertação, e através da qual o princípio activo se difunde até atingir o meio exterior. Com escolha de uma membrana com características adequadas, como a espessura, área e permeabilidade, pode-se atingir a cinética de libertação pretendida. Estes sistemas têm a vantagem de conseguirem conter uma maior quantidade de princípio activo, permitindo um tratamento mais prolongado, com a libertação de uma maior quantidade de princípio activo durante mais tempo. No entanto, caso a membrana seja danificada, todo o princípio activo é perdido.
- Sistema de matriz polimérica, representado na figura 2.1-B, no qual o princípio activo se encontra dissolvido ou disperso numa matriz polimérica. A libertação poderá dar-se por difusão do princípio activo na matriz; pela erosão da matriz polimérica, deixando, gradualmente, o princípio activo disponível; ou pela entrada de fluídos na matriz, fazendo com que as suas cadeias poliméricas adquiram flexibilidade, gerando um aumento de volume na estrutura e fazendo com que a libertação do princípio activo seja muito mais rápida. A libertação nestes sistemas está dependente da quantidade de princípio activo na matriz, a difusividade do princípio activo no polímero e a geometria do sistema.



Figura 2. 1- Esquema do sistema do tipo reservatório (A) e sistema do tipo matriz polimérica (B).^[19]

2.1. *Polímeros biodegradáveis em sistemas de libertação controlada*

Como foi referido anteriormente, para o tratamento de doenças do cólon, a administração oral de sistemas que possibilitem uma libertação controlada e local de princípios activos é o ideal. No entanto, a aplicação destes sistemas é algo complicado, devido às barreiras químicas, físicas e fisiológicas presentes no estômago e intestino delgado. Com a degradação ou absorção do princípio activo nestes locais, o mesmo interage com tecidos e células saudáveis, dando origem a efeitos adversos e a quantidade disponível no cólon não é suficiente para que o tratamento seja eficaz. Então, têm sido desenvolvidas novas estratégias para proteger o princípio activo das condições adversas do estômago e intestino delgado, minimizando a sua libertação nesses locais.

Muitas dessas estratégias baseiam-se na utilização de polímeros biodegradáveis. Esta classe de polímeros tem sido muito utilizada em sistemas de libertação controlada, desde há vários anos, uma vez que aumentam a acção terapêutica dos princípios activos no organismo, sem ser necessária uma posterior remoção do sistema. (Domb *et al.*, 2003; Langer, 1990)

Um dos requisitos dos polímeros utilizados para libertação controlada é serem biocompatíveis, isto é, não terem características tóxicas que provoquem danos nos sistemas biológicos.^[20]

Os polímeros biodegradáveis correntemente utilizados podem ser de origem sintética, como poliésteres, polianidridos, poliamidas ou polímeros baseados em fósforo, ou podem ser de origem natural, como polímeros baseados em proteínas ou polissacáridos.^[21]

Os polímeros possuem diversas propriedades, sendo possível conjugá-las e criar sistemas de libertação controlada no cólon, que protejam o princípio activo até este ser libertado. A utilização de polímeros com propriedades, tais como a dissolução apenas em meios alcalinos ou degradação por determinados microorganismos presentes no cólon origina sistemas mais eficazes. As várias estratégias utilizadas para a libertação controlada de princípios activos são apresentadas na tabela 2.1.

Tabela 2. 1- Estratégias utilizadas para a libertação de princípios activos no cólon.

Estratégia	Descrição
Pró-fármacos	Ligação covalente entre a molécula de fármaco e outra molécula ou polímero, o que dá origem a um composto farmacologicamente inactivo. A ligação só é destruída no cólon, mantendo o princípio activo inactivo no estômago e intestino delgado. ^{[10][11][26][28][30][36]}
Polímeros sensíveis ao pH	Princípio activo revestido ou presente numa matriz polimérica, utilizando polímeros que se dissolvem a pH alcalino e que mantêm a sua integridade a pH ácido. ^{[7][8][11][22][26][28][34][36]}
Sistemas de libertação activados pela microflora do cólon	Princípio activo revestido ou presente numa matriz polimérica, utilizando polímeros degradados apenas no cólon por microorganismos. ^{[4][6][7][8][10][11][13][23][24][25][27][28][29][31][32][33][34][35][36][37]}
Sistemas de libertação dependentes do tempo	Princípio activo revestido por polímeros que são resistentes ao ambiente ácido do estômago e que retardem a libertação do princípio activo para 3-5h após a entrada no intestino delgado. ^{[11][28][34][36]}
Sistemas bioadesivos	Sistemas que utilizam polímeros que se agreguem selectivamente à mucosa do cólon, aumentando o tempo de contacto e, consequentemente, a quantidade de princípio activo absorvido. ^[28]
Sistemas controlados pela pressão	Sistemas que são desintegrados pela alta pressão gerada pelos movimentos peristálticos do cólon, libertando o princípio activo. ^{[10][27][36]}
Sistemas osmóticos	Sistemas em que a libertação do princípio activo se dá por osmose. O princípio activo está contido num núcleo que está rodeado por membrana que controla a entrada de fluidos. A entrada de fluidos neste dispositivo cria uma pressão osmótica, que força o princípio activo a sair para o meio externo. ^{[10][34][36]}

Os sistemas dependentes do tempo e sensíveis a variações de pH assentam em princípios, como um tempo de residência constante no intestino delgado ou um aumento gradual do pH ao longo do sistema gastrointestinal. No entanto, tanto o tempo de retenção como o pH poderão variar bastante de acordo com os indivíduos, estado de doença e alimentação^[23], podendo, muitas vezes, tornar estes sistemas não específicos e, consequentemente, ineficazes.

Os sistemas constituídos por polímeros degradáveis pela microflora do cólon, objecto de estudo neste trabalho, assentam na degradação de certos materiais pela acção dos microorganismos presentes no cólon, mantendo a sua integridade no estômago e intestino delgado. Estes sistemas não dependem do pH nem do tempo de residência, mas sim de um mecanismo de acção que assenta unicamente no cólon, tendo um maior potencial para a libertação de princípios activos directamente neste local, devido à sua maior especificidade.

Ao longo de todo o sistema gastrointestinal, existe uma grande variedade de microorganismos, sendo que apenas uma pequena quantidade de microorganismos é encontrada no estômago e intestino delgado (cerca de 10^4 CFU/mL) (Simon and Gorbach, 1986), aumentando abruptamente no cólon, que conta com 10^{11} - 10^{12} CFU/mL. (Moore and Holdeman, 1975) Os microorganismos presentes no cólon adquirem a sua energia da fermentação de substratos que não foram digeridos no estômago e intestino delgado, como por exemplo, os polissacáridos. A fermentação é realizada por enzimas libertadas pelos microorganismos.

Os polissacáridos são polímeros constituídos por um ou dois monossacáridos, que diferem no tipo de monossacáridos constituintes, tipo de ligações entre monossacáridos e grau de ramificação. Os polissacáridos podem ter origem em animais, plantas, algas ou microorganismos.^[27]

Os polissacáridos são bastante utilizados para aplicações em sistemas de libertação controlada no cólon, porque mantêm a sua integridade no estômago e intestino delgado, uma vez que são

resistentes à acção das enzimas digestivas nestes locais mas são degradados no cólon, por acção de microorganismos.^[13] Além disso, apresentam vantagens tais como biocompatibilidade, grande abundância na natureza, baixo preço, um grande número de grupos derivatizáveis, diversos pesos moleculares e composições químicas, e são compostos aceites pelo FDA (US Food and Drug Administration) para aplicações farmacêuticas.^[23]

Neste estudo foram produzidos dois sistemas de libertação contendo polissacáridos distintos. O primeiro polissacárido utilizado foi o EPS, um polissacárido extracelular que ainda se encontra em desenvolvimento pelo grupo de Engenharia Bioquímica e Processos do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa e o segundo foi a goma de guar.

2.1.1. EPS

O EPS é um polissacárido extracelular aniónico, produzido por via bacteriana, através da bactéria *Enterobacter sp. A47 DSM 23139*, num meio contendo, como única fonte de carbono, o glicerol proveniente da indústria do biodiesel.^[38] O processo de produção do EPS foi desenvolvido por um grupo de investigadores, no Laboratório de Engenharia Bioquímica e Processos, pertencente à Faculdade de Ciências e Tecnologias, da Universidade Nova de Lisboa.

O início da produção do EPS é recente, pelo que a sua caracterização ainda não está completa.

No que diz respeito à composição química, o EPS é um polissacárido de elevado peso molecular que contém fucose, galactose, glucose, piruvato, succinato e acetato em rácios molares 1,6:1,3:1,1:1,2:0,7:1,5. O carácter aniónico do EPS é conferido pelo succinato e piruvato. O EPS é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, apresenta uma elevada capacidade de formar e estabilizar emulsões e capacidade de floculação.^[38]

Este polímero nunca foi utilizado para a produção de sistemas de libertação controlada, sendo este estudo pioneiro nessa área.

2.1.2. Goma de guar

A goma de guar é um polissacárido que tem origem na planta *Cyamopsis Tetragonolobus*, originária do subcontinente indiano.^[39] Esta planta está representada na figura 2.2.



Figura 2. 2 - Imagem da planta que dá origem à goma de guar, *Cyamopsis Tetragonolobus*.^[39]

A goma de guar é um polissacárido de elevada massa molecular e tem um aspecto de pó fino amarelado. A sua estrutura encontra-se na figura 2.3. Este polissacárido é constituído por uma cadeia linear de monómeros β -D-manopiranosose ligados por uma ligação β -(1-4), e por monómeros de α -D-galactopiranosil, que estão ligados à cadeia linear principal por ligações α -(1-6). (Goldsten, Alter and Seaman, 1992). Além dos monómeros anteriormente referidos, que constituem 80% da composição da goma de guar, esta contém 12% de água, 5% de proteínas, 2% de cinzas de ácido

solúvel e 0,7% de lípidos.^[27] É um polissacárido não iónico e bastante solúvel em água fria, dando origem a dispersões coloidais viscosas, que se assemelham a um gel.

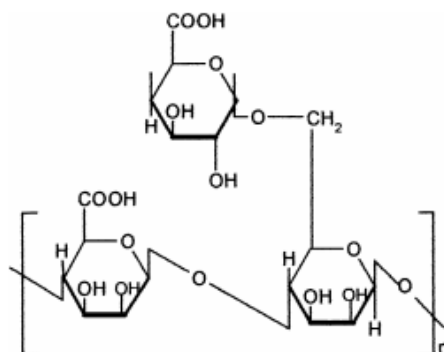


Figura 2. 3 - Estrutura química da goma de guar.^[41]

Em termos da sua degradação no cólon, a goma de guar é fermentada por *Bacteroides Ovatus*, uma bactéria Gram-negativa anaeróbia obrigatória. Gherardini et al., caracterizou três enzimas diferentes, produzidas pela *Bacteroides Ovatus*, que degradam a goma de guar, sendo elas duas galactomananases, que quebram a cadeia linear de manose; e uma α -galactosidase, que quebra as ligações da galactose à cadeia linear de manose.^[41]

A goma de guar tem aplicações em diversas áreas como a indústrias alimentar, têxtil, papel, de cosméticos e farmacêutica, na qual está a ser bastante estudada para a utilização para sistemas de libertação controlada no cólon.^[27]

Alguns estudos têm sido levados a cabo para o desenvolvimento de novos sistemas de libertação de princípios activos no cólon utilizando a goma de guar. Os princípios activos utilizados nesses estudos encontram-se na tabela 2.2:

Tabela 2. 2- Princípios activos utilizados em sistemas de libertação no cólon, constituídos por goma de guar, e respectivas referências.

Princípios Activos	Referências
Metotrexato	Chaurasia <i>et al.</i> , 2006 ^[13]
Dexametasone e Budesonide	Wong <i>et al.</i> , 1997 ^[42]
Indometacina	Prasad <i>et al.</i> , 1998 ^[42]
5-Ácido Aminosalicílico (5-ASA)	Prasad <i>et al.</i> , 1999 ^[42]
Mebendazole	Krishnaiah <i>et al.</i> , 2001 ^[42]
Metronidazole	Krishnaiah <i>et al.</i> , 2002 a ^[42]
5-Fluorouracil	Krishnaiah <i>et al.</i> , 2002 b ^[42]
Metoprolol Tartrato	Krishnaiah <i>et al.</i> , 2002 ^[43]
Hidrocloreto de Diltiazem	Al-Saidan <i>et al.</i> , 2005 ^[44]

2.1.3. Reticulação de polissacáridos

Os polissacáridos apresentam diversas vantagens na utilização em sistemas de libertação controlada no cólon. No entanto, existe uma limitação, que consiste no facto de os mesmos serem bastante hidrofílicos, sendo essa hidrofilicidade conferida pela presença de grupos hidroxilo, carboxilo, amino ou sulfónicos^[35] na sua estrutura. Como tal, na presença dos fluidos, existentes ao longo de todo o sistema gastrointestinal, os polissacáridos aumentam o seu volume devido à difusão desses mesmos fluidos na sua estrutura, o que causa uma libertação precoce e rápida do princípio activo.

De modo a contornar este inconveniente, deve recorrer-se à reticulação do sistema, tornando-o mais resistente à entrada de fluidos e à difusão do princípio activo para o exterior. A reticulação consiste na formação de uma rede, onde as várias cadeias do polissacárido estão ligadas por ligações covalentes, que tornam essas cadeias mais rígidas, dificultando assim a difusão de moléculas de água. A reticulação do sistema pode ser química, enzimática e física, como por exemplo, interações iónicas, cristalização, formação de pontes de hidrogénio ou reticulação por interações hidrofóbicas.^[35] Aos polissacáridos reticulados dá-se o nome de hidrogéis.

A presença de grupos hidróxilo e/ou carboxilo na estrutura dos polissacáridos permite uma reticulação química, na qual compostos químicos, denominados agentes reticulantes, reagem com esses mesmos grupos, dando origem a ligações cruzadas. Neste trabalho foram estudados quatro agentes reticulantes: divinilsulfona, glutaraldeído, poli(etileno glicol) diglicidil éter e 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

A divinilsulfona dá origem à reticulação através da reacção com os grupos hidróxilo do polissacárido. Esta reacção é favorecida em condições básicas, com um pH superior a 9, dando origem a ligações cruzadas sulfonil bi-etil.^[45] O esquema da reacção está representado na figura 2.4.

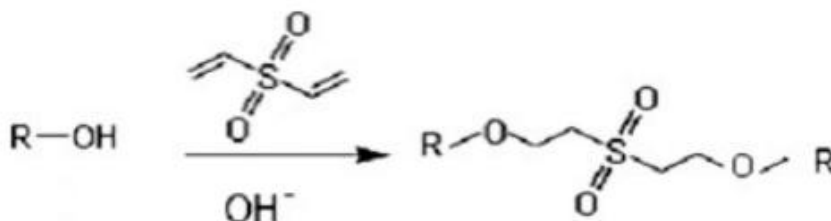


Figura 2. 4 - Esquema da reacção da divinilsulfona com grupos hidróxilo.^[46]

O glutaraldeído dá origem à reticulação através da reacção com os grupos hidróxilo. A reacção de reticulação é favorecida em condições ácidas, dando origem a ligações cruzadas hemiacetal ou éter.^[46] O esquema da reacção está representado na figura 2.5.

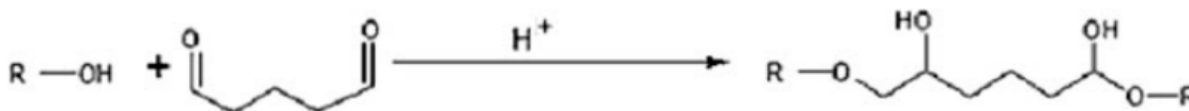


Figura 2. 5 - Esquema da reacção do glutaraldeído com grupos hidróxilo.^[46]

O agente reticulante poli(etileno glicol) diglicidil éter forma ligações cruzadas através da reacção do epoxi com os grupos hidróxilo. A hidrólise do grupo epoxi é controlada pelo pH, sendo que um pH entre 7 e 10 tornará a reacção de reticulação mais eficaz.^[45] O esquema da reacção está representado na figura 2.6.

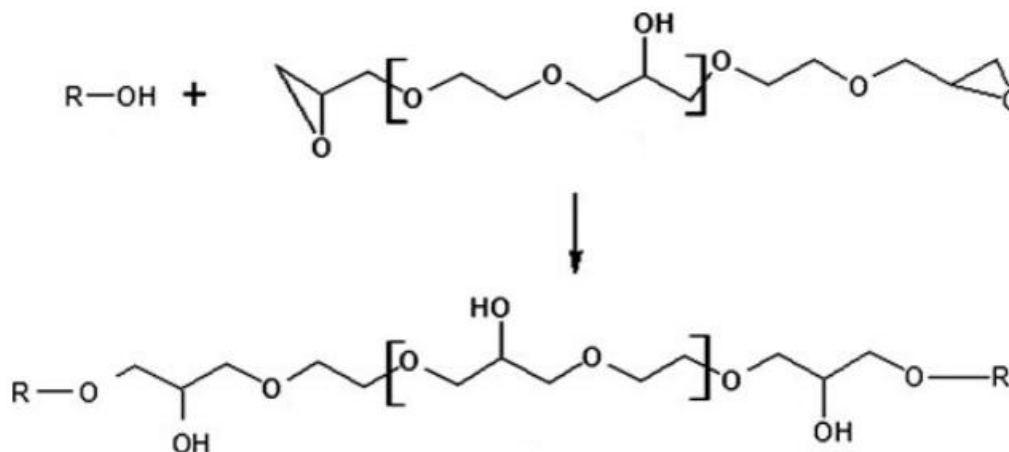


Figura 2. 6 - Esquema da reacção do poli(etileno glicol) diglicidil éter com grupos hidróxilo.^[46]

A reticulação, utilizando o agente químico 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, é efectuada através das ligações em grupos carboxilo e hidróxilo. A reacção é favorecida em condições ácidas, com o pH entre 4 e 5, uma vez que caso o pH seja inferior, este agente reticulante é instável e a um pH superior a velocidade de reacção diminui.^[45] Como se pode observar na figura 2.7, dá-se a reacção do grupo carboxilo com a 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, dando origem a O-acylisourea. Esta última reage, posteriormente, com grupos carboxilo para formar um anidrido, sendo que esse anidrido reage com os grupos hidróxilo, dando origem às ligações de reticulação.

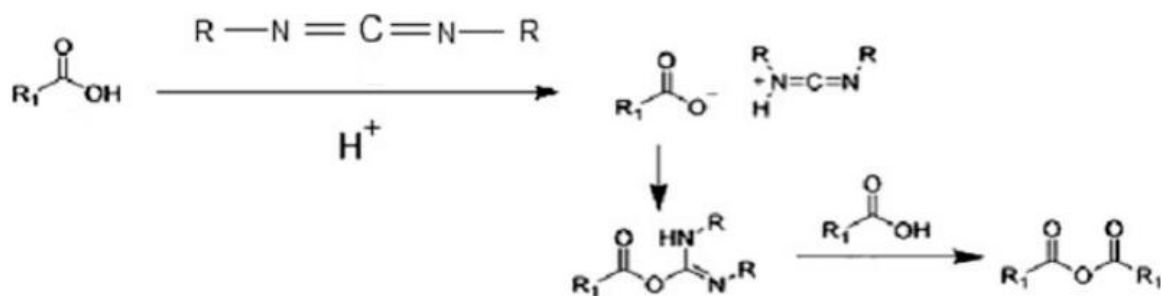


Figura 2. 7 - Esquema da reacção do 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.^[46]

2.2. Mecanismos de libertação controlada

De modo a poder desenhar um sistema de libertação controlada que tenha a capacidade de providenciar um tratamento eficaz, é necessário que o mesmo liberte com uma cinética adequada. Para isso, é necessário compreender os mecanismos pelos quais o princípio activo é libertado.

Os hidrogéis, sistemas estudados neste trabalho, podem libertar o princípio activo neles contido através de três mecanismos diferentes, sendo eles a difusão, o inchamento da estrutura polimérica e a degradação química.

2.2.1. Mecanismo de libertação por difusão

O mecanismo de libertação por difusão, como se pode observar na figura 2.8, consiste no transporte das moléculas do princípio activo através da matriz polimérica, até serem libertadas para o meio externo.

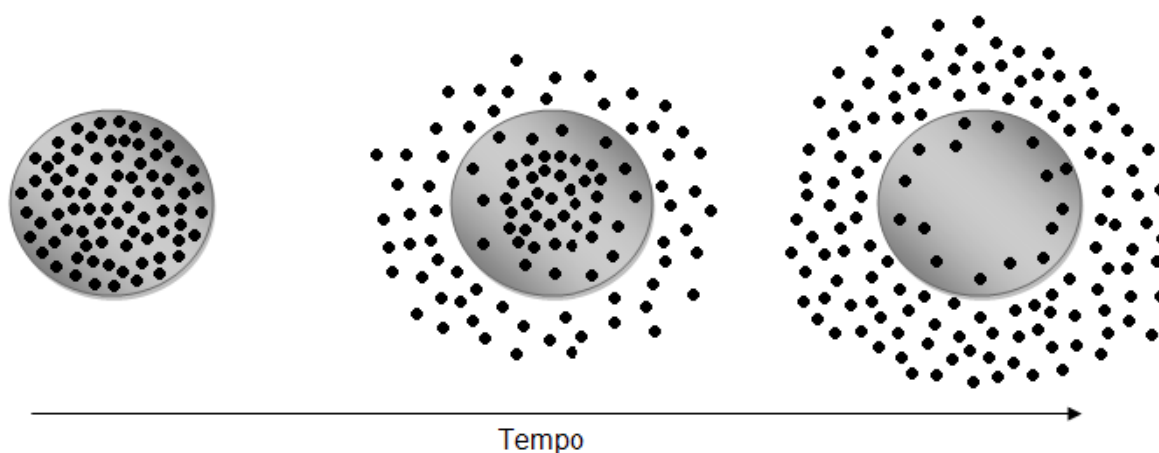


Figura 2. 8 - Esquema de libertação por difusão^[19]

Os factores que mais influenciam este mecanismo de libertação são a solubilidade e a difusividade.

A difusividade é uma propriedade cinética que descreve a facilidade com que as moléculas de princípio activo se movem através do polímero, podendo esta ser afectada por vários factores, tais como as características do polímero e do princípio activo.

A solubilidade é uma propriedade de equilíbrio que descreve a interacção entre a matriz polimérica e o princípio activo e, quanto maior for esta interacção, menor será a velocidade de difusão, devido a uma maior retenção do princípio activo. A solubilidade depende de factores, como ligações que se possam formar do contacto princípio activo/polímero; polaridade ou presença de estruturas de cadeias poliméricas altamente densas.

2.2.2. Mecanismo de libertação por inchamento da estrutura polimérica

Os polímeros hidrofílicos, quando em contacto com uma solução aquosa, absorvem as moléculas de água, ocorrendo um aumento do volume da estrutura polimérica.

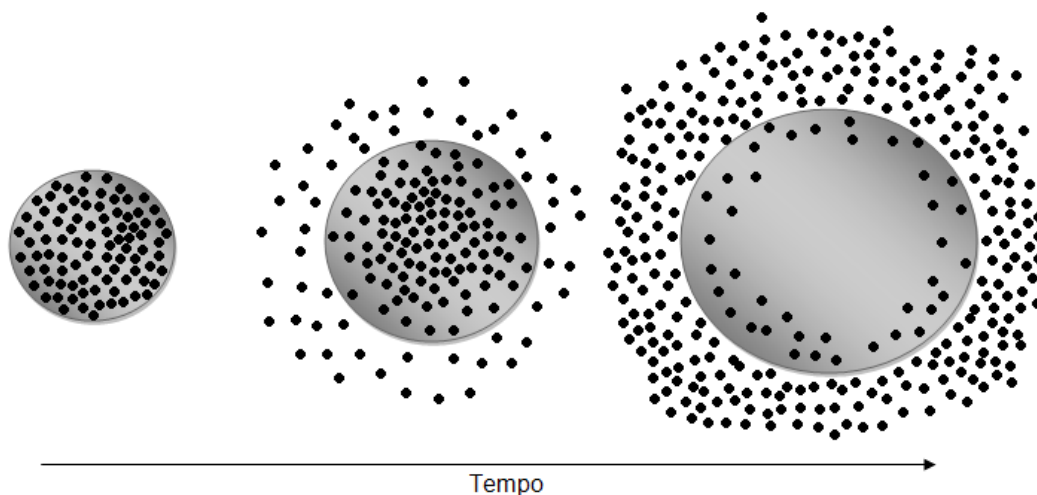


Figura 2. 9 - Esquema de libertação por inchamento da estrutura polimérica^[19]

Quando os polissacáridos estão completamente secos, a difusividade do princípio activo é bastante reduzida. No entanto, e como se pode observar na figura 2.9, quando os polissacáridos entram em contacto com fluidos, o volume da sua estrutura aumenta devido à absorção dos mesmos, o que aumenta a flexibilidade das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a difusividade do princípio activo. Como tal, não ocorre libertação do princípio activo a menos que a matriz polimérica se encontre na sua forma inchada. (Hopfenberg, Apicella, and Saleeby 1981; Korsmeyer and Peppas 1981; Korsmeyer 1990). O fenómeno de inchamento da estrutura do polissacárido depende da difusão do solvente no polímero e da relaxação das cadeias poliméricas.

2.2.3. *Mecanismo de libertação por degradação química*

Este mecanismo consiste na ocorrência de reacções químicas na estrutura da matriz polimérica, originando a sua degradação e libertando o princípio activo. A libertação por degradação química pode ou não estar associada à libertação por difusão. A degradação química de uma matriz polimérica pode ocorrer apenas na sua superfície, quando a degradação da superfície é mais rápida do que a difusão de fluidos na matriz polimérica; ou pode ocorrer em toda a sua extensão, quando a velocidade da difusão de fluidos através da matriz polimérica é superior à degradação da sua superfície. Esta degradação pode ocorrer por hidrólise ou por acção enzimática.

A degradação superficial ocorre principalmente em polímeros hidrofóbicos, que não permitem a entrada de fluidos no seu interior. Este tipo de degradação está representado na figura 2.10.

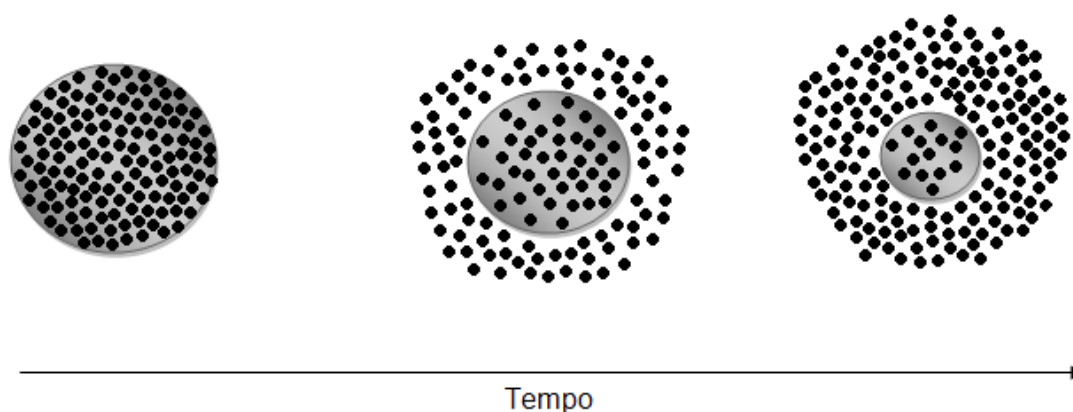


Figura 2. 10 - Esquema do mecanismo de liberação por degradação superficial da estrutura polimérica. ^[19]

A degradação em toda a matriz polimérica, representada na figura 2.11, ocorre preferencialmente em polímeros com grande capacidade de absorção de água, que é o caso dos polissacáridos. Neste caso, os fluidos penetram na estrutura polimérica e a degradação dá-se em toda a sua extensão e não apenas na superfície.

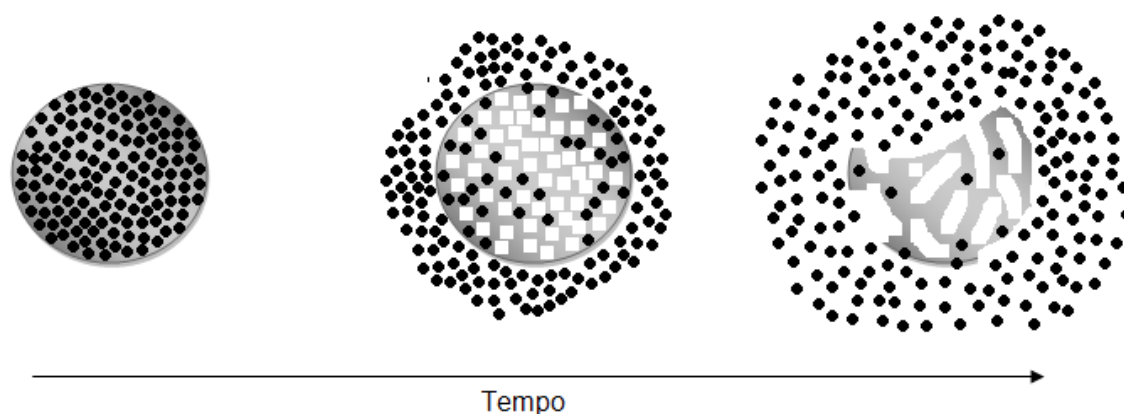


Figura 2. 11 - Esquema do mecanismo de liberação por degradação estrutural do polímero. ^[19]

Este mecanismo de liberação não é puramente controlado pela erosão polimérica, uma vez que, como há entrada de fluidos na matriz, há também a difusão do princípio activo.

2.3. Cinéticas de liberação

Uma das maiores vantagens dos sistemas de liberação controlada de princípios activos é o facto de se poder escolher uma cinética desejada, o que permite uma maior eficácia na utilização destes sistemas. Em termos da liberação de fármacos anticancerígenos, uma cinética adequada é muito importante, uma vez que é necessário manter uma concentração óptima dos mesmos nas células tumorais ou no sangue, sem nunca atingir uma concentração tão baixa que torne o tratamento ineficaz ou uma concentração tão elevada que seja tóxica. ^[18]

As cinéticas de liberação podem ser classificadas em três tipos: cinética de ordem zero, cinética $t^{1/2}$ e cinética de primeira ordem. ^[18]

- **Cinética de ordem zero-** Esta cinética caracteriza-se por uma liberação constante ao longo do tempo, não dependente da quantidade de princípio activo presente na formulação.

$$r = k * [P]^0 = k \quad (2.1)$$

em que:

r- cinética de reacção

k- constante

[P]- concentração de princípio activo

0- ordem de reacção

- **Cinética $t^{-1/2}$** - Esta cinética caracteriza-se por uma dependência da velocidade de libertação com o tempo, uma vez que o decréscimo da taxa de libertação é proporcional à raíz quadrada do tempo.
- **Cinética de primeira ordem**- Nesta cinética, a velocidade de libertação depende da quantidade de fármaco na formulação. Neste caso, a velocidade de libertação é proporcional à concentração de princípio activo na formulação; como esta vai diminuindo ao longo do tempo, a velocidade de libertação tem um decréscimo exponencial.

$$r = k * [P]^1 = k * [P] \quad (2.2)$$

A representação gráfica das três cinéticas encontra-se na figura 2.12:

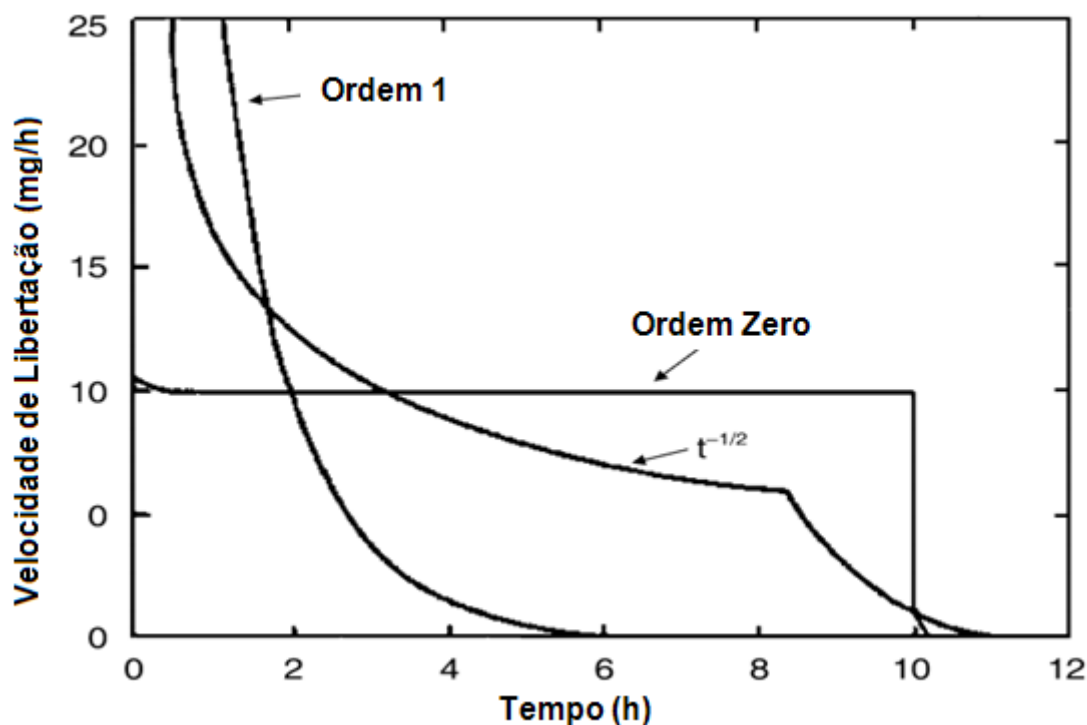


Figura 2. 12 - Representação gráfica das cinéticas de libertação.^[16]

2.4. Métodos de produção de micropartículas

A grande variedade de princípios activos e polímeros com diferentes propriedades exige a utilização de diferentes métodos de produção.

A selecção de um método de produção tem de cumprir certos requisitos, tais como não afectar a estabilidade e actividade biológica do princípio activo, a eficiência de encapsulação do princípio activo no polímero tem de ser o mais elevada possível, os perfis de libertação do princípio activo deverão estar de acordo com o pretendido e o método deverá ser exequível a nível industrial.^[16]

Embora tenham sido desenvolvidos diversos métodos de produção de micropartículas, não há nenhum que seja totalmente eficiente havendo sempre alguma limitação.

Neste estudo foram utilizados três métodos de produção de micropartículas, sendo eles o método da emulsificação, “Spray Drying” e o método de precipitação.

2.4.1. Método de emulsificação

O procedimento prático deste método resume-se a três passos, sendo eles:

- a) Dissolução do polímero em água. O princípio activo pode ser dissolvido ou disperso na solução do polímero;
- b) Posteriormente, é formada uma emulsão da solução do polímero e princípio activo num solvente orgânico ou óleo, que não poderá ser miscível com o solvente do polímero e o princípio activo e no qual a solubilidade do polímero e o princípio activo seja baixa. A emulsão é estabilizada com a adição de um emulsificante. São então formadas duas fases: uma fase dispersa da solução do polímero e princípio activo e uma fase contínua do solvente orgânico ou óleo;
- c) As partículas formadas são removidas do solvente orgânico ou óleo da fase contínua sendo, posteriormente, lavadas e liofilizadas.

Este método tem sido amplamente utilizado numa escala laboratorial. No entanto, por ser um método que funciona em batch, a sua aplicação a nível industrial é muito complicada e cara. Este método de produção de micropartículas é vantajoso, na medida em que permite um controlo dos tamanhos das micropartículas, através da velocidade de agitação do meio. Contudo, este método apresenta limitações como uma eficiência de encapsulação não muito elevada e a utilização de solventes tóxicos, que podem deixar resíduos nas micropartículas.^{[13][47]}

2.4.2. “Spray Drying”

O “Spray Drying” é uma técnica bastante versátil, sendo amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentar e biotecnológica e desde os anos 70 que esta técnica é utilizada para a produção de micropartículas para sistemas de libertação controlada de princípios activos.^[48]

O polímero é dissolvido num solvente próprio e o princípio activo é disperso ou dissolvido na solução do polímero. A solução do polímero e princípio activo é introduzida por meio de uma bomba peristáltica numa câmara de secagem. Três tubagens estão ligadas à câmara de secagem, com diferentes funções: entrada da solução do polímero e princípio activo na câmara de secagem; fornecimento de ar comprimido, que fará com que a solução passe pelo atomizador; fornecimento de ar quente, que causará uma evaporação do solvente da solução do polímero e princípio activo. Com a remoção do solvente, o polissacarídeo passa pelo atomizador e formam-se microesferas, sendo que estas precipitam no ciclone.

Este processo tem sido bastante utilizado devido a vantagens como a facilidade de transposição para um plano industrial, rapidez de produção, obtenção eficiências de encapsulação superiores às

obtidas por outros métodos; e pode ser utilizado para uma grande variedade de polímeros e de princípios activos. É um processo cuja produção é efectuada num só passo e produz micropartículas com características semelhantes às obtidas por outros processos, relativamente à distribuição de tamanhos, morfologia e cinética de libertação. No entanto, apresenta os inconvenientes de haver uma grande percentagem de perdas, uma vez que as micropartículas se agregam bastante às paredes do ciclone, sendo bastante difícil recuperá-las; e de não se poderem processar soluções de elevada viscosidade.^{[48][16][20]}

2.4.3. Método de precipitação

Este método de produção de micropartículas foi adaptado do novo método referido por Cui-Yun Yu *et al.*^[49]

A solução do polímero é introduzida, gota a gota, com uma seringa numa solução ou solvente, nos quais o polímero não seja solúvel. Como tal, formam-se macroesferas à saída da seringa. Por último, o tamanho das macroesferas é reduzido com a utilização do Ultra-Turrax, dando origem a micropartículas.

Este método apresenta vantagens tais como reduzida complexidade e rapidez de execução. No entanto, também apresenta certas desvantagens, tais como ser um processo impraticável a nível industrial; poder fazer uso de solventes orgânicos prejudiciais à saúde, os quais podem estar presentes em quantidades residuais na formulação final; e no passo da trituração das micropartículas, algum do princípio activo pode ser perdido.

2.4.4. Outros métodos correntemente utilizados

Além dos três métodos referidos anteriormente, são também utilizados para a produção de micropartículas os métodos apresentados na tabela 2.3:

Tabela 2. 3 - Métodos de produção de micropartículas correntemente utilizados, e respectivas referências.

Experiências	Referências
Evaporação/extracção do solvente	[16], [48], [50], [51]
Polimerização interfacial	[48], [50]
Polimerização <i>in situ</i>	[16], [50]
Coacervação ou separação de fases	[16], [48], [50]
Precipitação com fluídos super-críticos	[16], [20], [48], [50]
“Spray Congealing”	[50]

2.5. Factores que influenciam a libertação do princípio activo

Nos sistemas de libertação controlada de princípios activos, é necessário ter o conhecimento dos factores que influenciam a libertação do princípio activo, de modo a poder desenhar um sistema com a cinética mais adequada às necessidades do paciente.

As características do polímero utilizado no sistema, das moléculas do princípio activo ou do mecanismo de libertação do princípio activo são determinantes para a velocidade de libertação do princípio activo.

Os polímeros podem apresentar estruturas cristalinas, onde as cadeias poliméricas estão dispostas de um modo organizado; estruturas amorfas, onde as cadeias poliméricas se encontram desordenadas, não apresentando uma estrutura organizada; e estruturas semi-cristalinas, apresentando zonas com características cristalinas e com características amorfas. A difusão é extremamente reduzida em polímeros cristalinos, uma vez que as cadeias poliméricas não têm a flexibilidade necessária, sendo os movimentos destas bastante limitados. Em polímeros amorfos, dependendo da temperatura, estes poderão encontrar-se no seu estado vítreo ou elástico. Quando a temperatura é inferior ao valor da temperatura vítrea do polímero, este encontra-se num estado em que as cadeias poliméricas estão muito rígidas, sendo a difusão bastante difícil. Acima dessa temperatura, as cadeias poliméricas adquirem uma certa mobilidade, permitindo uma maior flexibilidade das cadeias e aumentando a difusividade, estando o polímero no seu estado elástico. Em estruturas semi-cristalinas, a difusão é praticamente limitada às zonas amorfas.

No que diz respeito ao princípio activo, o seu tamanho e forma são muito importantes para a ocorrência da sua libertação. Caso a estrutura polimérica seja porosa e o tamanho dos poros seja superior ao tamanho da molécula de princípio activo, a difusão é elevada. Caso o polímero tenha poros inferiores ao tamanho da molécula do princípio activo ou não tenha poros, a difusão é bastante reduzida, devido ao impedimento estérico sofrido pelas moléculas de princípio activo, que dificulta bastante a sua difusão.

A velocidade de libertação depende igualmente do mecanismo de libertação. Para a libertação por difusão, as propriedades da interacção polímero-princípio activo são importantes, uma vez que quanto mais fortes forem as ligações que se formam, maior é o tempo de retenção do princípio activo no polímero e menor será a velocidade de libertação. Também é necessário ter em conta que a velocidade de libertação tende a diminuir ao longo do tempo, uma vez que o princípio activo mais próximo da superfície vai ser libertado em primeiro lugar e mais rapidamente e, à medida que o que está mais no interior vai sendo libertado, o caminho difusional vai aumentando e maiores serão os obstáculos à sua difusão, diminuindo a velocidade de libertação.

No mecanismo de libertação por inchamento da estrutura polimérica, a entrada de moléculas de água na estrutura polimérica aumenta a flexibilidade das cadeias poliméricas, aumentando a difusão. Como tal, quanto maior for a difusividade das moléculas de água no polímero, maior será a difusão do princípio activo. A relaxação das cadeias poliméricas também é muito importante, uma vez que quanto maior for a sua relaxação, maior será a sua flexibilidade e, como tal, maior será a difusão do solvente e do princípio activo. Um dos modos de reduzir o inchamento de uma estrutura polimérica é a reticulação. Em polímeros, a difusividade decresce proporcionalmente ao aumento da densidade de reticulação e à diminuição do comprimento das ligações de reticulação entre as cadeias poliméricas. (Barrer and Skirrow 1984; Stannett et al. 1962)

No mecanismo de libertação por degradação química, a libertação do princípio activo é dependente do modo como a degradação ocorre. Na degradação superficial a integridade estrutural do polímero é mantida e, escolhendo uma geometria do dispositivo adequada, é possível definir uma cinética de ordem zero.^[52] Quando o mecanismo de libertação é por degradação de toda a estrutura polimérica, em primeiro lugar há a difusão dos fluidos do organismo pela matriz polimérica, ocorrendo a libertação por difusão simples. Como o gradiente de concentração é elevado, as moléculas de princípio activo tendem a libertar-se rapidamente. Em seguida, há uma fase em que a libertação se dá, tanto por erosão como por difusão e a cinética é semelhante à cinética de ordem zero. Por último, devido ao avançado estado de degradação da estrutura polimérica, dando origem a estruturas de pequenas dimensões e a difusão nessas estruturas é maior, aumentando, deste modo, a velocidade de libertação.^[1]

2.6. *Fármacos modelo: 5-Fluorouracil e Tegafur*

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um agente antineoplástico que pertence ao grupo das fluoropiridiminas. Este princípio activo foi sintetizado pela primeira vez em 1957, por Heidelberger *et al.*,^[53] e é amplamente utilizado no tratamento do cancro do cólon. (Calabresi and Chabner 1992).^[24] O 5-FU

é também utilizado no tratamento dos cancros da mama, cabeça e pescoço.^[7] Apesar disso, este princípio activo apresenta alguns efeitos secundários como a toxicidade severa do sistema gastrointestinal ou mielossupressão.^[54]

O 5-FU é um fármaco de reduzido peso molecular, 130,08 g/mol, e a sua estrutura química é a apresentada na figura 2.13.

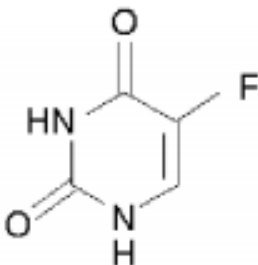


Figura 2. 13 – Estrutura química da molécula de 5-Fluorouracil.^[55]

A acção do 5-FU manifesta-se, quer através da sua incorporação nas moléculas de DNA ou RNA, (parando o seu crescimento), quer através da inibição da enzima responsável pela síntese do DNA, timidilato sintetase.^[14]

Uma libertação controlada de 5-FU no cólon através de administração oral é a mais conveniente para os pacientes. Como tal, foram desenvolvidos sistemas de libertação controlada no cólon em grânulos de pectinato de cálcio^[24], micropartículas de alginato, reticuladas por cloreto de cálcio e revestidas por Eudragit S-100^[7], microsferas de PLGA^[56] ou microsferas de pectina revestidas por S-100^[8] para contornar todos os inconvenientes já referidos. Também podem ser administrados pró-fármacos do 5-FU, moléculas farmacologicamente inactivas que são absorvidas intactas, como por exemplo o tegafur.^{[9][57]}

O Tegafur, 1-(tetrahydro-2-furanil)-5-fluorouracil, é um pró-fármaco do 5-FU^[55] que é utilizado no tratamento dos cancros da mama, pulmão, cérebro e do cólon.^[58] Os efeitos secundários que provoca são mais frequentes no sistema gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarreia) e no sistema neurológico. As complicações de ordem neurológica limitam bastante a utilização do tegafur como agente terapêutico.^[52]

Tal como o 5-FU, é considerado um princípio activo de reduzido peso molecular, 200,16 g/mol e a sua estrutura química está representada na figura 2.14.

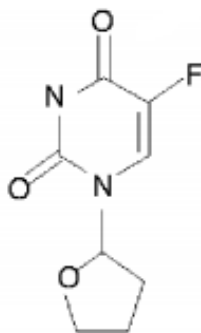


Figura 2. 14 - Estrutura química do Tegafur.^[55]

O tegafur apresenta uma boa absorção gastrointestinal e tem um tempo de meia-vida no organismo de 5 – 12 horas.^[53]

O tegafur é lentamente metabolizado em 5-FU por dois caminhos metabólicos distintos, sendo um deles mediado pelo citocromo p450 e o outro pelas enzimas solúveis sistémicas.^[55]

3. *Materiais e Métodos*

3.1. *Materiais*

Os polissacáridos utilizados para a produção das micropartículas foram o polissacárido extracelular (EPS), cedido pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica e de Processos, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, e a goma de guar, fornecida pela Sigma Aldrich.

Para a produção de micropartículas pelo método da emulsificação, foram utilizados o castor oil e o emulsificante span 80, fornecidos pela Fluka. A lavagem das micropartículas obtidas por este método foi efectuada utilizando propanol, com uma pureza superior a 99,8%, fornecido pela Fluka.

Para a produção de micropartículas pelo método de precipitação, foi utilizada acetona, com uma pureza superior a 99,5%, fornecida pela Fluka.

Vários agentes reticulantes foram utilizados neste estudo, sendo eles o ácido sulfúrico concentrado, fornecido pela Panreac; a divinilsulfona, fornecida pela Aldrich Chemicals; o 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e o glutaraldeído, fornecidos pela Fluka; e o etileno glicol diglicidil éter, fornecido pela Aldrich. Foi também utilizado o hidróxido de sódio, fornecido por EKA.

Os fármacos utilizados neste estudo foram o Tegafur, fornecido por Tokyo Chemical Industry Co., LTD. e o 5-Fluorouracil, fornecido pela Sigma.

Para a realização dos ensaios de libertação foi necessária a utilização de ácido clorídrico 37% e cloreto de sódio sólido, com uma pureza mínima de 99,5%, fornecidos pela Panreac; e tampão fosfato salino (PBS), fornecido pela Sigma Aldrich.

3.2. *Métodos*

Micropartículas contendo fármaco anti-cancerígeno foram produzidas por diferentes métodos, agentes reticulantes e condições de operação, tais como a temperatura ou a velocidade de agitação. Posteriormente, procedeu-se à caracterização das micropartículas, estudando a sua morfologia por microscopia electrónica de varrimento, eficiência de encapsulação do fármaco por HPLC, composição química por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, capacidade de absorção de água e porosidade. Para estudar a cinética de libertação do fármaco, realizaram-se ensaios de libertação.

3.2.1. *Preparação das micropartículas*

As micropartículas foram produzidas por três métodos distintos: método de emulsão, método de precipitação e Spray-Dryer.

a) Método de emulsão

Por este método apenas se produziram micropartículas sem fármaco. Preparou-se uma solução de polissacárido, adicionando 200 mg deste a:

- i) 15 mL de água destilada, para os agentes reticulantes ácido sulfúrico concentrado e a mistura glutaraldeído e ácido sulfúrico concentrado;
- ii) 15 mL de solução 0,01 M de ácido clorídrico, para o agente reticulante EDC;
- iii) 15 mL de solução 0,01 M de hidróxido de sódio, para os agentes reticulantes divinilsulfona e etileno glicol diglicidil éter.

A solução do polissacárido previamente preparada foi adicionada a uma mistura contendo 100 g de Castor oil e uma massa de emulsificante Span 80, que varia entre 3 e 5 g, de acordo com a experiência realizada, num gobelet, agitada com um rotor Heidolph RZR 2051 Control e uma vareta com pás de vidro, com velocidade de rotação e temperatura controladas, formando uma emulsão de água em óleo (W/O). Em seguida o agente reticulante foi adicionado à emulsão e a mistura permaneceu sob agitação durante diferentes períodos de tempo, entre 2 e 4 horas, dependendo da experiência realizada.

Devido à reacção de reticulação, o polissacárido precipita originando micropartículas.

As micropartículas produzidas foram centrifugadas, (centrífuga Sigma 4K15 Sartorius), a uma velocidade de 12000 rpm durante 5 minutos e lavadas três vezes com propanol, de modo a remover os resíduos de castor oil. Em seguida, as micropartículas foram lavadas três vezes com água destilada, para remover os resíduos de propanol.

Posteriormente, as micropartículas são liofilizadas, utilizando um liofilizador Totelstar Cryodos com uma bomba de vácuo Varion DS 102.

b) “Spray Dryer”

As micropartículas foram produzidas utilizando o “Spray Dryer” da marca Lab Plant, modelo SD-05, situado no Instituto Superior de Agronomia, em Lisboa, com a orientação do Professor Doutor Vítor Alves.

O funcionamento do “Spray Dryer” está descrito no capítulo 2.4.2.. Uma solução com 100 mL de água e 667 mg de polissacárido foi introduzida no Spray Dryer. Neste equipamento apenas se pode controlar a temperatura de secagem e o caudal de entrada da solução do polissacárido no sistema. De modo a ocorrer uma evaporação total da água presente na solução do polissacárido e também para não se submeter as micropartículas a elevadas temperaturas, optimizaram-se a temperatura de secagem e o caudal de entrada. O valor óptimo obtido para a temperatura de secagem foi 150 °C e para o caudal de entrada da solução do polissacárido foi de 229,7 mL/h. O valor da pressão da corrente de ar comprimido foi 1,7 bar e a temperatura à saída do equipamento foi de 71 °C.

c) Método de precipitação

A solução do polissacárido foi preparada do mesmo modo que o referido em a). Neste caso, foram produzidas micropartículas com e sem fármaco. Quando houve adição de fármaco, a massa adicionada do mesmo foi 50 mg. Foi preparada uma solução 80:20 de acetona/água sob agitação magnética. A acetona foi escolhida uma vez que não dissolve nenhum dos polissacáridos utilizados neste estudo. A adição de água à acetona teve como objectivo facilitar a reacção de reticulação.^[46]

Foi adicionado o agente reticulante à solução 80:20 de acetona/água e, em seguida, adicionou-se a solução do polissacárido, com uma seringa, gota a gota.

Foram obtidas macropartículas com tamanhos entre 1 e 1,5 milímetros. Para se reduzir o seu tamanho, as macropartículas foram sujeitas à acção do Ultra-Turrax T25, da Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, com uma velocidade de 8000 rpm, durante 1 minuto e com descanso de 1 minuto. Este procedimento foi repetido três vezes.

As micropartículas obtidas foram então sujeitas à reacção de reticulação durante um determinado período de tempo, à temperatura ambiente numa incubadora orbital Optic Ivymen® System, com uma velocidade de rotação de 120 rpm.

As micropartículas reticuladas foram lavadas com acetona, colocadas numa estufa a 37°C até evaporação completa, e liofilizadas.

Macropartículas sem fármaco foram colocadas em 10 mL de uma solução aquosa de 5mg/mL de princípio activo durante 6 horas, de forma a poder ocorrer a difusão desta última para o interior das partículas. Por fim, as macropartículas foram lavadas três vezes com água destilada e liofilizadas.

• Planeamento de Experiências

Neste estudo o objectivo é a produção de micropartículas para libertação controlada no cólon, podendo as características das mesmas ser influenciadas por certos parâmetros de produção. Como tal, para otimizar as características das micropartículas, é necessário determinar qual a influência desses parâmetros nas mesmas, recorrendo-se para isso, a um planeamento de experiências.

Esta é uma técnica na qual se realizam um certo número de experiências, modificando em cada uma delas certas variáveis, as variáveis independentes. Posteriormente é possível determinar a influência de cada uma dessas variações na resposta final e obter um modelo matemático que permita otimizar a mesma.

O modelo de planeamento de experiências escolhido para este estudo foi o desenho de experiências do composto central. Com este modelo a influência das variáveis independentes na resposta final pode ser estudada não só dentro do intervalo de interesse para o estudo, como para além deste, com a introdução dos pontos α que se encontram fora do intervalo de interesse.

O desenho de experiências do composto central é constituído por:

- Desenho factorial de experiências (experiências de 1 a 8);
- Experiências no ponto central (experiências de 9 a 11);
- Experiências com a introdução dos pontos α (experiências 12 a 17).^[59]

Como se pode observar na figura 3.1, o desenho de experiências do composto central permite estudar a influência de três variáveis na resposta final num intervalo de interesse (representado pelo cubo) e além desse intervalo de interesse (representado pelos pontos externos ao cubo).

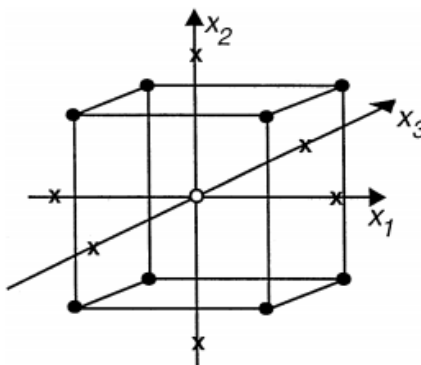


Figura 3. 1 - Representação gráfica do desenho de experiências do composto central, para três variáveis independentes.^[59]

Para a aplicação deste planeamento de experiências ao estudo em causa, é necessário definir as variáveis que se quer otimizar (variáveis dependentes) e as variáveis que se quer manipular para se obter uma resposta desejada (variáveis independentes).

O planeamento de experiências foi realizado apenas para o método por precipitação, uma vez que o método por emulsificação não deu origem a micropartículas e o método de “Spray Dryer” resultou num reduzido rendimento de micropartículas obtidas.

3.2.2. *Caracterização das micropartículas*

As micropartículas produzidas foram caracterizadas em termos do seu tamanho e morfologia externa por microscopia electrónica de varrimento, quantidade de princípio activo incorporado, ligações químicas presentes por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, aumento de volume em meios aquosos, porosidade, por ASAP e cinética de libertação.

3.2.2.1. *Morfologia externa das micropartículas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)*

As características morfológicas externas das micropartículas foram observadas no microscópio electrónico de varrimento da JEOL, modelo JSM7001F, situado no Instituto Superior Técnico.

3.2.2.2. *Eficiência de Encapsulação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*

A eficiência de encapsulação consiste na quantidade de princípio activo que está presente nas micropartículas produzidas, relativamente à quantidade utilizada na sua produção.

Determinou-se a quantidade de princípio activo encapsulado de duas formas distintas, consoante se trate de micropartículas reticuladas ou não reticuladas.

1) **Micropartículas não reticuladas**

Devido à ausência de agente reticulante, as micropartículas de goma de guar não apresentam resistência à entrada de fluidos e, passado algum tempo em solução aquosa, dissolvem-se totalmente. O procedimento adoptado para a quantificação do princípio activo foi o seguinte:

- 1.1) Adição de 50 mg de micropartículas a 50 mg de PBS;
- 1.2) Agitação na incubadora, com uma velocidade de 120 rpm, durante 53 horas, para uma dissolução total das micropartículas e libertação do princípio activo encapsulado;
- 1.3) Centrifugação da solução, durante 5 minutos a uma velocidade de 12000 rpm e recolha do sobrenadante;
- 1.4) Lavagem do precipitado das micropartículas obtido na centrifugação, de modo a colectar eventuais resíduos de princípio activo;

2) **Micropartículas reticuladas**

Dado que estas micropartículas apresentam ligações cruzadas, o que limita a entrada dos fluidos, o procedimento anteriormente descrito poderá não ser eficaz. Como tal, adoptou-se o seguinte procedimento:

- 2.1) 20 mg de micropartículas são colocadas em 20 mL de PBS;
- 2.2) Destruição das micropartículas utilizando um sonicador Dr. Hielscher, UP 200 S. O sonicador é accionado durante 3 minutos, com 3 minutos de descanso. Este procedimento é repetido 3 vezes.
- 2.3) Agitação da solução na incubadora, com uma velocidade de 120 rpm, durante 53 horas;
- 2.4) Remoção do sobrenadante dos resíduos de polissacárido, que é efectuada do mesmo modo utilizado para as micropartículas não reticuladas.

Em ambos os procedimentos, os sobrenadantes foram analisados para quantificação do fármaco por HPLC VWR Hitachi Auto-Sampler L-220, Elite Lachrom, com o software EzChromeLite e com a

coluna RP18, coluna de fase reversa. Neste sistema, a fase estacionária apresenta uma natureza mais apolar que a fase móvel. Por isso os compostos apolares, devido à sua afinidade com outros compostos apolares, permanecem um maior tempo na fase estacionária e os compostos polares, devido à sua afinidade com a fase móvel, são removidos mais rapidamente.^[60] Os fármacos foram detectados com um detector de UV (Merck Hitachi, Japão) ao comprimento de onda 260 nm e é contabilizado o seu tempo de retenção na coluna.

Dois fármacos foram quantificados por HPLC, sendo eles o Tegafur e o 5-Fluorouracil.

O eluente utilizado foi uma solução 85/15 de tampão acetato pH 4.4/acetonitrilo, a um caudal de 0,8 mL/min.

De modo a se poder proceder a uma posterior quantificação do princípio activo, construíram-se rectas de calibração para cada princípio activo. Fizeram-se 7 padrões para cada princípio activo, de concentrações entre 0,2 mg/L e 40 mg/L.

3.2.2.3. *Determinação da composição das micropartículas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)*

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada para determinar os constituintes das micropartículas e ligações químicas presentes. Este método não permite uma quantificação. O sistema utilizado foi Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX. O procedimento seguido foi o seguinte:

- 1) Adicionar 1 mg das micropartículas a 100 mg de brometo de potássio. O brometo de potássio é utilizado por ser transparente à radiação infravermelha, não introduzindo qualquer curva no espectro obtido posteriormente, sendo que a informação obtida diz apenas respeito ao composto a analisar;
- 2) Triturar as micropartículas até se formar um pó muito fino;
- 3) Fazer uma pastilha com o pó obtido, recorrendo a uma prensa a altas pressões;
- 4) Com a utilização do programa *Spectrum*, determinar o espectro correspondente.

3.2.2.4. *Estudos de capacidade de absorção de água*

O agente reticulante reage com os grupos hidroxilo da goma de guar, originando um determinado grau de reticulação, o que limita a absorção de água pelas micropartículas devido a uma diminuição na mobilidade das cadeias poliméricas. Como tal, quanto maior for o volume de agente reticulante adicionado, maior será o grau de reticulação. Assim, foram efectuadas medidas da capacidade de absorção de água pelas micropartículas obtidas como medida do seu grau de reticulação. Para este efeito, utilizou-se um sistema de filtração por vácuo, com uma bomba de vácuo Edwards High Vacuum Two Stage e filtros de acetato de celulose, com um diâmetro de poro 0,45 µm, da marca Gema Medical.

O procedimento adoptado foi o seguinte:

- 1) Colocar uma determinada massa de micropartículas em PBS e deixar a solução na incubadora a 37°C, com uma velocidade de agitação de 120 rpm, durante um certo período de tempo;
- 2) Filtrar uma solução de PBS e pesar o filtro;
- 3) Filtrar a solução contendo as micropartículas;
- 4) Pesar o filtro onde ficaram retidas as micropartículas;
- 5) Calcular o aumento do peso das micropartículas, pela diferença entre o peso obtido em 4 e em 2.

Dado que é necessário algum tempo para se atingir o equilíbrio de absorção de moléculas de água pelas micropartículas, foi efectuado um procedimento preliminar para se determinar esse tempo. Foram efectuados estes ensaios às micropartículas com uma maior quantidade de agente reticulante adicionada, durante 2, 3, 5 e 7 horas e determinou-se qual o tempo necessário para se atingir o equilíbrio. Esse tempo foi utilizado nos ensaios posteriores.

3.2.2.5. *Medidas de porosidade por ASAP*

As medidas de porosidade das micropartículas foram realizadas num porosímetro por adsorção de azoto Micromeritics ASAP 2010. As micropartículas são submetidas a 50°C, durante 12 horas, de modo a remover os gases presentes nos seus poros. Posteriormente, a amostra é termostatizada com azoto líquido. O processo é efectuado a vácuo e a uma temperatura controlada. É introduzido azoto gasoso a 77 K na amostra, o qual vai ser adsorvido pelas micropartículas, podendo-se determinar a área superficial.

3.2.3. *Ensaio de Libertação*

Os ensaios de libertação foram realizados de modo a determinar os perfis de libertação de princípio activo das micropartículas produzidas. Foram realizados em dois meios distintos, simulando as condições pelas quais as micropartículas terão de passar no organismo:

- i) Meio ácido (simulação do meio do estômago): efectuou-se uma solução 1,5 M de NaCl e adicionaram-se gotas de solução de ácido clorídrico, até o pH da solução tomar um valor entre 1 e 2.
- ii) Meio ligeiramente alcalino (simulação do meio do cólon): solução de PBS 7.4.

Pesaram-se 20 mg de micropartículas com fármaco e foram colocadas num falcon com 20 mL de meio. Os falcons foram colocados na incubadora, com uma velocidade de 120 rpm e uma temperatura de 37°C.

Foram recolhidas amostras a determinados intervalos de tempo, retirando 2 mL de sobrenadante e preenchendo o volume em falta com o respectivo meio fresco. Os ensaios de libertação do meio ácido demoraram 24h e os do meio ligeiramente alcalino 53h.

As amostras retiradas foram congeladas, para uma posterior quantificação do princípio activo por HPLC, conforme descrito em 3.2.2.2..

4. Resultados e Discussão

Neste trabalho foram estudados dois sistemas de libertação controlada de princípios activos, para o tratamento do cancro do cólon. O sistema produzido utilizando o EPS foi caracterizado morfológicamente através de microscopia electrónica de varrimento. O sistema produzido utilizando goma de guar foi caracterizado na sua morfologia através da microscopia electrónica de varrimento, foram efectuados procedimentos para determinar a quantidade de princípio activo presente nas micropartículas e os seus perfis de libertação, foi utilizado o método da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para determinar a composição das micropartículas e foram efectuados estudos de absorção de água para determinar a influência de diferentes quantidades de agente reticulante na entrada de fluidos nas micropartículas.

4.1. Micropartículas de EPS

4.1.1. Método por emulsificação

Foram efectuadas várias tentativas no sentido da obtenção de micropartículas que libertassem o mínimo de princípio activo possível a pH ácido e que libertassem de um modo controlado a pH neutro/básico.

Estudos levados a cabo pela equipa responsável pelo estudo e produção do EPS revelaram que este polissacárido não é solúvel a pH ácido e é solúvel a pH básico. Assim, e com o objectivo de se obter uma libertação controlada do fármaco no intestino, procedeu-se à reticulação dos grupos do EPS das micropartículas, o que limita o acesso das moléculas de água ao polissacárido.

O primeiro estudo efectuado foi a determinação de um agente reticulante que conferisse às micropartículas as características desejadas. Como tal, foram efectuadas experiências utilizando quatro agentes reticulantes, sendo eles a auto-reticulação com ácido sulfúrico concentrado, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), etileno glicol diglicidil éter e a divinilsulfona.

4.1.1.1. Caracterização morfológica

Procedeu-se à reticulação do EPS em solução por auto-reticulação com ácido sulfúrico concentrado. A experiência foi realizada com uma temperatura de 50°C, uma velocidade de agitação de 1000 rpm, uma massa de span 80 de 3 g e um volume de ácido sulfúrico concentrado de 0,5 mL. A mistura reaccional foi colocada sob agitação durante 2 horas.

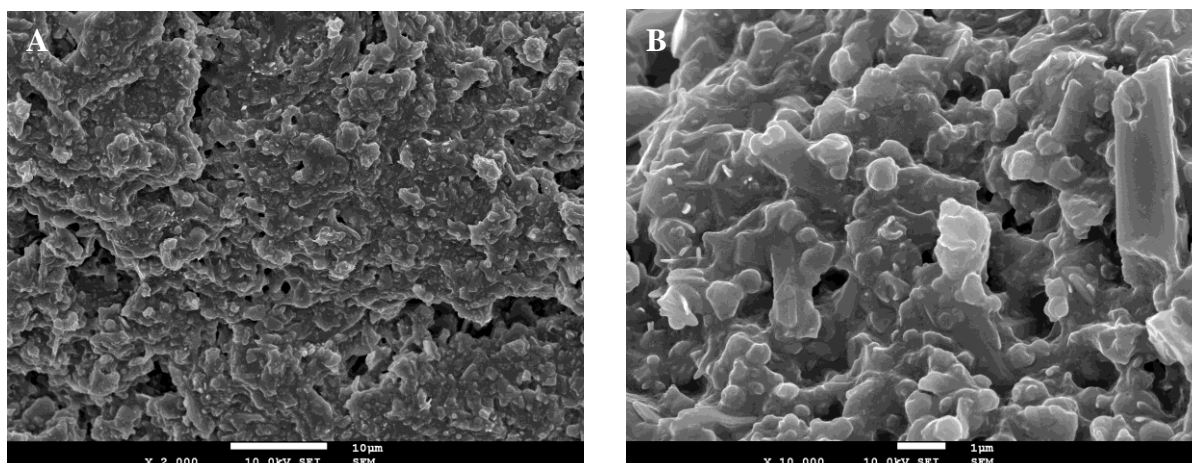


Figura 4. 1 - Micropartículas de EPS auto-reticuladas com ácido sulfúrico concentrado.
A- Ampliação de 2.000 vezes; B- Ampliação de 10.000 vezes.

A um nível macroscópico, esta experiência originou um pó de cor amarelada, o que evidencia uma quebra do polímero em unidades de menores dimensões. A nível microscópico, como se pode observar na figura 4.1, foram originados grandes agregados de partículas, com leves indícios de formação de partículas de pequenas dimensões.

A divinilsulfona é um agente químico que origina a reticulação do polissacárido por ligação com os seus grupos hidroxilo. A experiência utilizando este agente reticulante foi efectuada à temperatura ambiente, com uma velocidade de agitação de 421 rpm, com uma massa de span 80 de 5 g e uma massa de divinilsulfona de 0,6372 g. Esta mistura esteve a homogeneizar durante 2 horas.

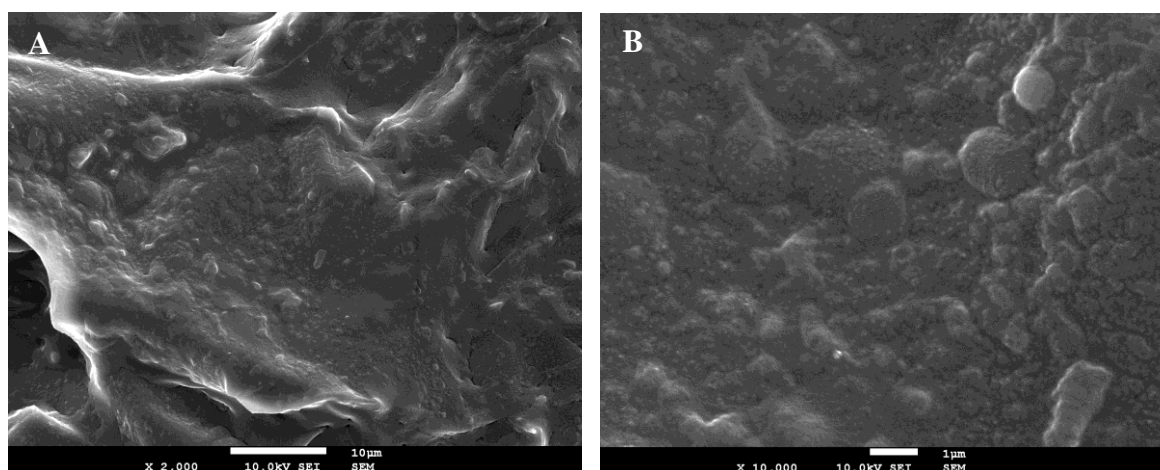


Figura 4. 2 - Micropartículas de EPS, reticuladas com divinilsulfona.
A - Ampliação de 2.000 vezes; B - ampliação de 10.000 vezes.

Numa perspectiva macroscópica, não se obteve um pó, mas sim o que parece ser uma massa muito semelhante ao polímero puro. Numa perspectiva microscópica, observando as imagens 4.2, pode confirmar-se a visão macroscópica. Esta experiência não deu origem a micropartículas, mas sim a um grande agregado de polissacárido. No entanto, é visível a formação, embora bastante precoce, de micropartículas com uma forma esférica e de poucas partículas com formas irregulares.

O EDC é um agente químico que reticula através de ligações com os grupos hidroxilo e carboxilo do polissacárido. Esta experiência, utilizando o EDC, foi realizada à temperatura ambiente, com uma velocidade de agitação de 437 rpm, uma massa de span 80 de 5g, uma massa de agente reticulante de 0,838g e o tempo de mistura foi de 2 horas.

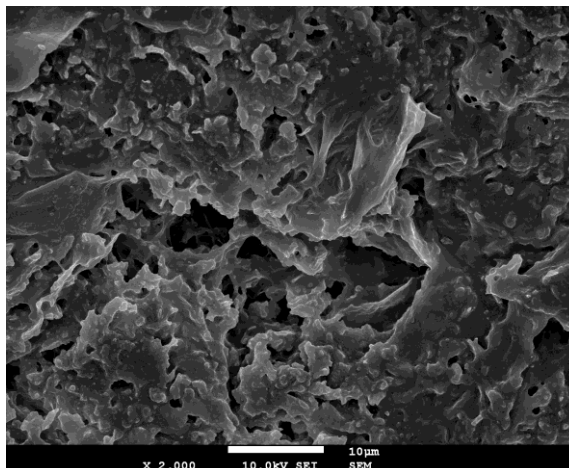


Figura 4. 3 – Micropartículas de EPS, reticuladas com EDC.

Macroscopicamente, tal como ocorreu na experiência com a divinilsulfona, observou-se um grande aglomerado de polímero muito semelhante ao polímero puro. As imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varrimento (figura 4.3) confirmam a visão macroscópica, uma vez que não se formaram partículas ou agregados individualizados.

O etileno glicol diglicidil éter é um agente químico que origina ligações cruzadas, reagindo com os grupos hidroxilo do polissacárido. A experiência levada a cabo com este agente reticulante foi realizada à temperatura ambiente, com uma velocidade de agitação de 421 rpm, uma massa de emulsificante de 5 g, uma massa de etileno glicol diglicidil éter de 0,9396 g. Esta mistura esteve sob agitação durante 2 horas.

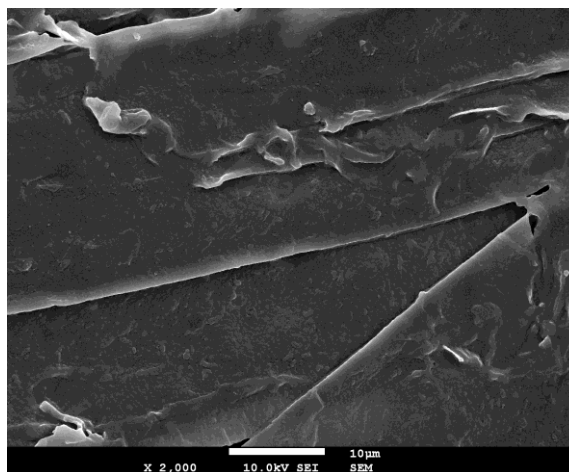


Figura 4. 4 - Experiência de produção de micropartículas de EPS reticuladas com etileno glicol diglicidil éter.

Á semelhança da visão macroscópica das experiências utilizando como agentes reticulantes a divinilsulfona e o EDC, esta experiência deu origem a uma massa de polissacárido que se assemelha bastante ao polissacárido no seu estado inicial, o que vem ser confirmado pela figura

4.4, que mostra uma massa de polímero, sem qualquer sinal de formação de micropartículas individualizadas.

Como se pode verificar pelos resultados apresentados anteriormente, em nenhuma das experiências efectuadas houve a formação de micropartículas individualizadas. A experiência que mais se aproximou do objectivo pretendido foi a da auto-reticulação com ácido sulfúrico concentrado. As experiências com divinilsulfona e EDC apresentam um leve indício de formação de micropartículas, sendo este mais visível na experiência com divinilsulfona, pois na superfície da massa de polímero podem ser observadas microesferas, embora muito pouco diferenciadas. Na experiência com a reticulação por etileno glicol diglicidil éter, o polissacárido parece não ter sofrido qualquer alteração após ser submetido ao processo de produção. Estes resultados podem ser justificados pela influência de certos factores, tais como o tempo de mistura, velocidade de agitação, a quantidade de emulsificante e de agente reticulante. Quando a emulsão é estabilizada sob agitação, é gerada uma tensão de cisalhamento, à qual as partículas serão sujeitas. Essa tensão gera forças nas partículas, que causam a sua ruptura e dão origem a partículas de dimensões mais reduzidas. Como tal, quanto maior for a velocidade de agitação, maior será a tensão de cisalhamento e quanto maior for o tempo de mistura, mais longa será a exposição das partículas a essa tensão e, conseqüentemente, uma maior redução nos seus tamanhos será observada. Quando a velocidade de agitação e o tempo de mistura são reduzidos, a tensão de cisalhamento não permite uma redução significativa nos tamanhos das partículas, dando origem a partículas de maiores dimensões ou agregados. O tempo de mistura poderá também afectar as reacções da estabilização da emulsão e de reticulação, uma vez que para um tempo reduzido, estas reacções podem ser incompletas.

A utilização de um emulsificante em sistemas de emulsão causará uma diminuição da tensão interfacial entre as duas fases imiscíveis, tornando a emulsão estável. Como tal, uma quantidade insuficiente não permite uma redução significativa na tensão superficial, causando uma maior tendência para as partículas mais pequenas se agregarem, dando origem a agregados de maiores dimensões.

A quantidade de agente reticulante também pode ter conduzido a estes resultados, uma vez que o conjunto de factores referido anteriormente pode ter dado origem a agregados de partículas demasiado grandes e o agente reticulante disponível não ser suficiente para originar ligações cruzadas em toda a superfície dos agregados. A auto-reticulação com ácido sulfúrico concentrado parece ser o método mais eficiente para a reticulação de micropartículas de EPS. O facto de o EPS ter uma grande capacidade de estabilizar emulsões também pode ter conduzido a estes resultados, uma vez que esta capacidade faz com que o exopolissacárido tenha uma grande afinidade para com o óleo, não se formando micropartículas.

Uma vez que as experiências que mais se aproximaram do resultado pretendido foram a da auto-reticulação com ácido sulfúrico concentrado e a da reticulação com divinilsulfona, os seus protocolos experimentais foram alterados numa tentativa de se obterem micropartículas individualizadas. No processo de auto-reticulação com ácido sulfúrico concentrado, é provável que a velocidade de agitação, a quantidade de emulsificante, o tempo de reacção e a quantidade de agente reticulante tenham causado a pouca individualização das micropartículas. Como tal, os valores destes parâmetros foram aumentados e foi efectuada uma nova experiência, com uma velocidade de agitação de 1500 rpm, um volume de agente reticulante de 0,75 mL, uma massa de emulsificante span 80 de 4 g, estando a mistura reaccional a agitar durante 4 horas. As imagens do microscópio electrónico de varrimento das micropartículas obtidas após estas alterações encontram-se na figura 4.5.

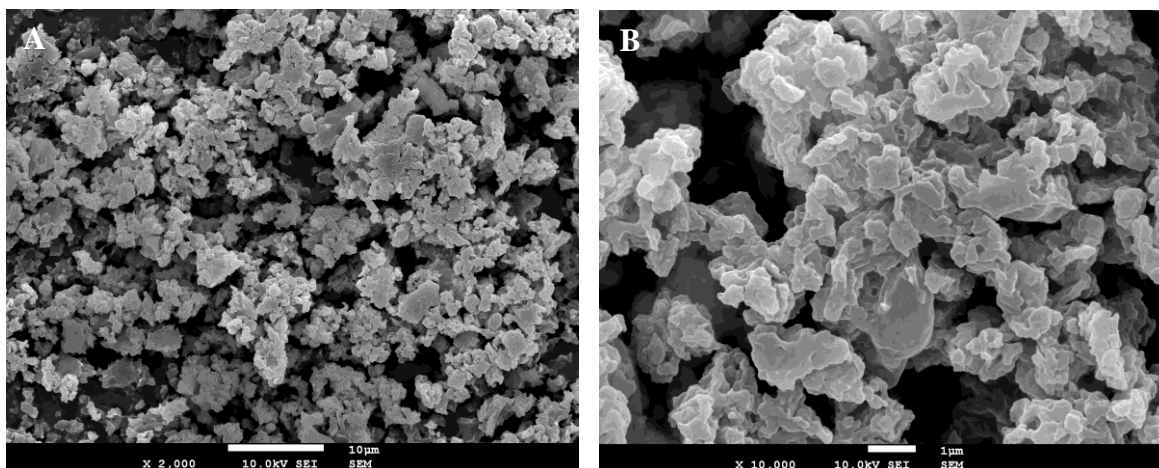


Figura 4. 5 – Micropartículas de EPS, auto-reticuladas com ácido sulfúrico concentrado, com as alterações ao protocolo experimental.

A - Ampliação de 2.000 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

Relativamente à experiência inicial, as alterações efectuadas no protocolo experimental deram origem a uma maior individualização dos agregados, podendo distinguir-se microagregados de partículas, com formas irregulares. Os tamanhos das partículas variam estes entre 1µm e 10µm.

No que diz respeito à experiência efectuada utilizando como agente reticulante a divinilsulfona, apenas se aumentou a velocidade de agitação para 1500 rpm e o tempo de reacção para 4 horas. Os restantes parâmetros foram mantidos.

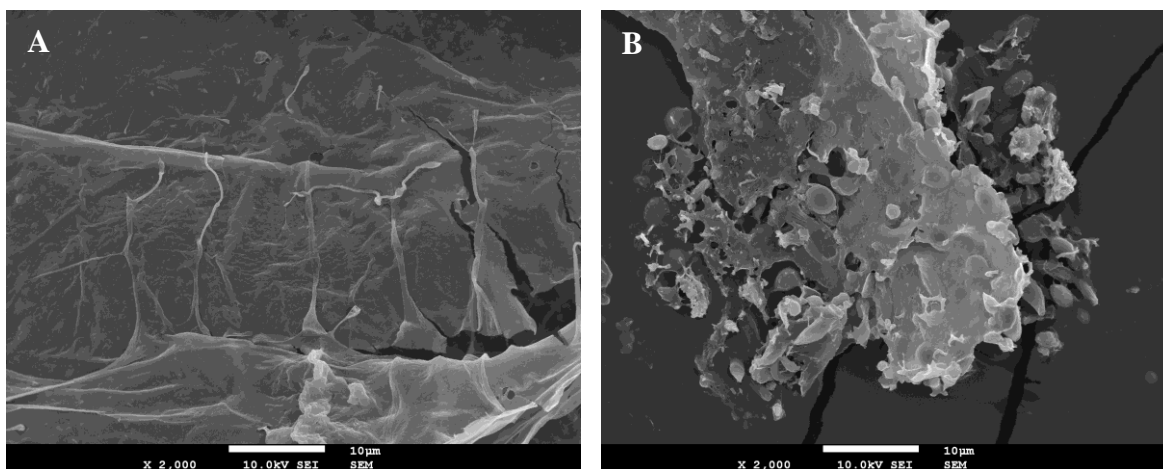


Figura 4. 6 – Micropartículas de EPS, reticuladas com divinilsulfona, com as alterações ao protocolo experimental.

A - Ampliação de 2.000 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

A um nível microscópico, embora ainda predominem os grandes agregados de polímero, formaram-se poucas partículas parcialmente e totalmente individualizadas, como se observa na figura 4.6. Com estas duas experiências, comprovou-se a influência dos factores considerados como responsáveis do pouco sucesso das experiências iniciais. A experiência com auto-reticulação apresenta um resultado mais próximo do pretendido. A experiência com reacção de reticulação utilizando divinilsulfona ainda não apresenta os resultados desejados, muito provavelmente pela grande agregação do EPS ao óleo devido ao seu grande efeito surfactante.

4.1.1.2. *Ensaio de dissolução*

As melhores micropartículas de EPS foram obtidas pelo método da emulsificação, auto-reticuladas na presença de ácido sulfúrico concentrado. Como tal, para determinar se estas micropartículas cumprem os objectivos pretendidos neste estudo, ou seja, uma elevada integridade no estômago, durante 4 horas, e a degradação lenta e controlada no cólon, durante 2 dias, realizou-se um ensaio de dissolução. Uma certa massa de micropartículas foi colocada num meio ácido, simulando as condições do estômago e num meio neutro/básico, simulando as condições do cólon.

De acordo com as observações macroscópicas, em meio ácido as micropartículas apresentaram uma reduzida dissolução, durante as 4 horas de realização da experiência. Como tal, as micropartículas produzidas podem passar pelo estômago com um mínimo de perdas, cumprindo um dos objectivos deste estudo.

No que diz respeito à experiência efectuada em meio neutro/básico, verificou-se que logo nos primeiros minutos houve uma rápida degradação das micropartículas. Como tal, é possível uma libertação no cólon, mas não de forma controlada.

Estes resultados podem ser devidos ao facto de as micropartículas se auto-reticularem em meios cujo pH é reduzido, daí a integridade das mesmas se manter em meio ácido. Já em meio neutro/básico não se dá origem à auto-reticulação das micropartículas, tornando-as mais susceptíveis à entrada dos fluidos e a uma consequente degradação. Pode também ser devido à auto-reticulação não ser eficaz em solução. Assim, optou-se por não se prosseguir os estudos de produção de micropartículas com EPS pelo método por emulsificação.

4.1.2. “Spray Dryer”

A morfologia das micropartículas de EPS obtidas por “Spray Dryer” encontra-se na figura 4.7.

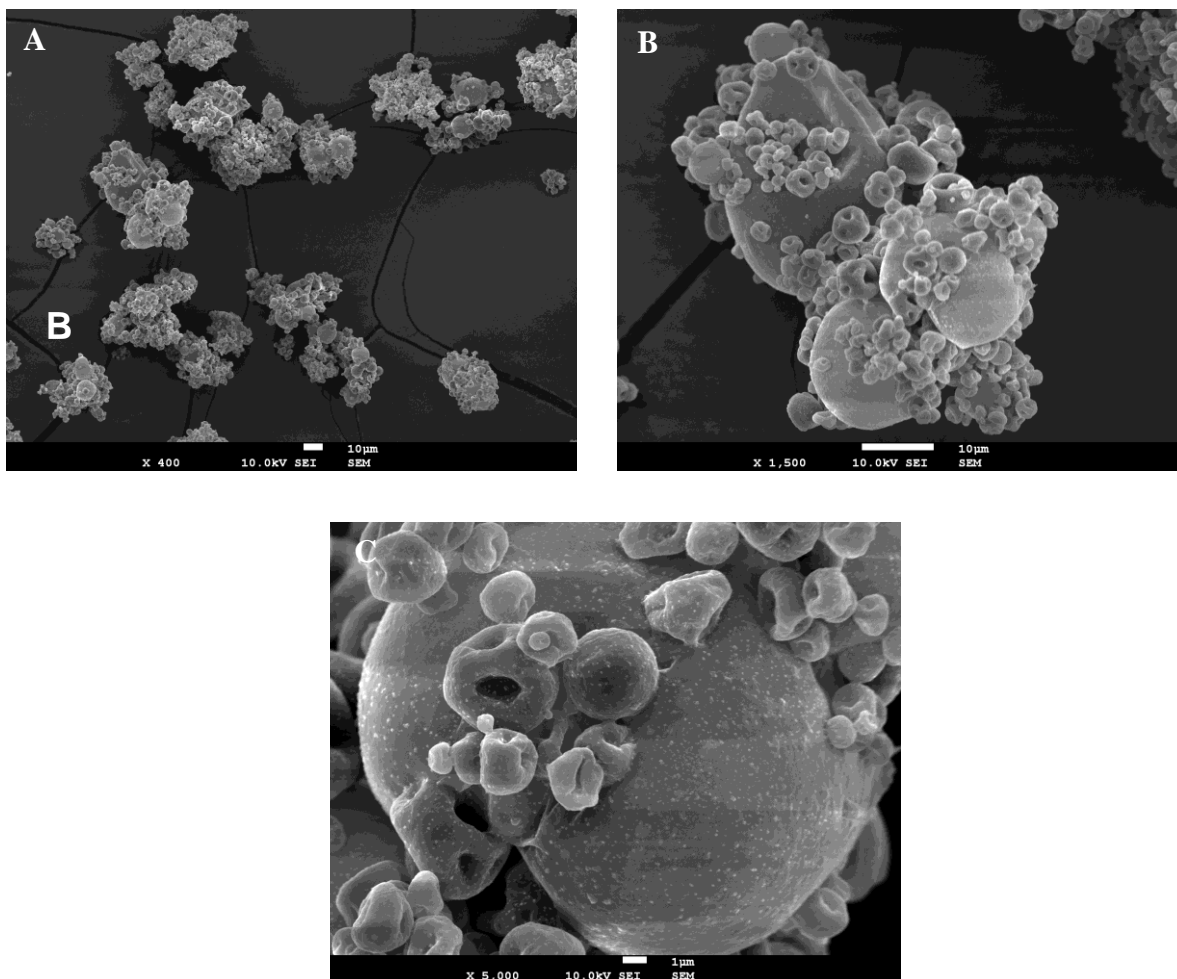


Figura 4. 7 - Micropartículas de EPS obtidas por “Spray Drying”.
A - Ampliação de 400 vezes; B – Ampliação de 1.500 vezes; C - Ampliação de 5.000 vezes.

Como se pode observar na figura 4.7, obtiveram-se poucas micropartículas de maiores dimensões, cujos tamanhos variam entre 10 e 30 μm , e um grande número de partículas de menores dimensões, que se encontram sobre as micropartículas de maiores dimensões, cujos tamanhos variam entre 1 e 5 μm . As micropartículas obtidas têm duas formas predominantes, sendo elas a forma esférica, muitas vezes com algumas deformações e a forma de um disco. M. Glavas Dodov *et al.* produziram micropartículas de quitosano e alginato através da utilização do Spray Dryer e reportaram morfologias semelhantes às apresentadas na figura 4.7. Conclui-se que as deformações sofridas pelas micropartículas tiveram origem no processo de secagem.^[33] Na figura 4.7-C, é possível observar a presença de alguns poros na superfície das micropartículas.

No entanto, o rendimento obtido por este método foi muito reduzido, uma vez que de 200 mg de polissacárido inseridos no sistema apenas se conseguiram recuperar 38 mg de micropartículas, o que resulta num rendimento de 19%. As perdas são devidas maioritariamente à deposição das micropartículas nas paredes do ciclone, sendo bastante difícil recuperá-las. Como tal, decidiu-se não utilizar mais este método de produção de micropartículas de EPS. No entanto, este é um

método a explorar, uma vez que produz micropartículas esféricas perfeitas, como o pretendido e o ideal seria aumentar o rendimento de micropartículas obtidas.

4.1.3. Método de precipitação

Efectuou-se uma tentativa de produção de micropartículas, que consistiu em introduzir uma solução do EPS através de uma seringa, numa solução 80/20 de acetona/água.

Com este método não se obtiveram micropartículas, uma vez que, em contacto com a solução de acetona/água, o polissacárido desfez-se em pequenas fibras, não sendo possível obter micropartículas.

4.2. Micropartículas de goma de guar

4.2.1. “Spray Dryer”

Foram produzidas micropartículas de goma de guar utilizando o equipamento do “Spray Dryer”. As micropartículas obtidas foram caracterizadas morfológicamente. As fotografias obtidas por microscopia electrónica de varrimento encontram-se na figura 4.8.

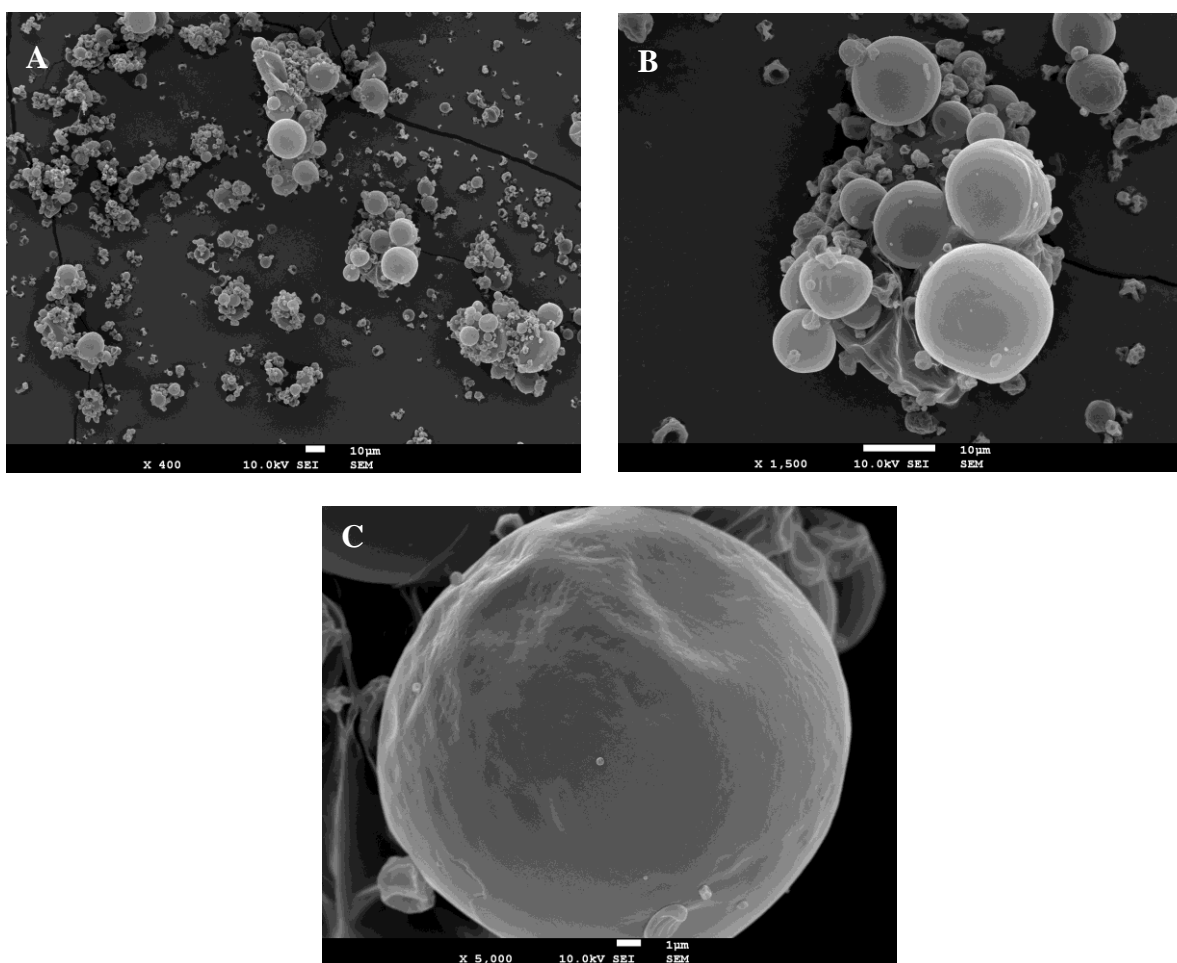


Figura 4. 8 - Micropartículas de goma de guar obtidas por “Spray Drying”.
A - Ampliação de 400 vezes; B - Ampliação de 1.500 vezes; C - Ampliação de 5.000 vezes.

Como se pode verificar na figura 4.8, formaram-se micropartículas de maiores dimensões cujos tamanhos variam entre 10 e 20 μm , de forma esférica perfeita, e formaram-se também micropartículas de menores dimensões, cujos tamanhos variam entre 1 e 5 μm . Ao contrário das micropartículas de EPS, as micropartículas de goma de guar apresentam uma superfície lisa, isenta de poros.

No entanto, à semelhança do que ocorreu com as micropartículas de EPS, também o rendimento de micropartículas de goma de guar formadas, relativamente à massa polissacárido introduzida inicialmente no sistema, é de apenas 9,63 %. Como tal, embora se formem micropartículas de formas esféricas perfeitas, com base no baixo rendimento decidiu-se não realizar mais estudos com este método. No entanto, com os resultados obtidos, este é um método a explorar devido aos motivos apresentados anteriormente.

4.2.2. Método de precipitação

4.2.2.1. Experiências preliminares

Em primeiro lugar, efectuou-se uma experiência utilizando uma solução de goma de guar e fazendo-a precipitar numa solução de 80/20 de acetona/água. Os resultados mostraram que as gotas da solução do polissacárido mantiveram a forma que adquiriam à saída da seringa, originando macropartículas. Como tal, as macropartículas obtidas foram reduzidas a micropartículas pela utilização do Ultra-Turrax.

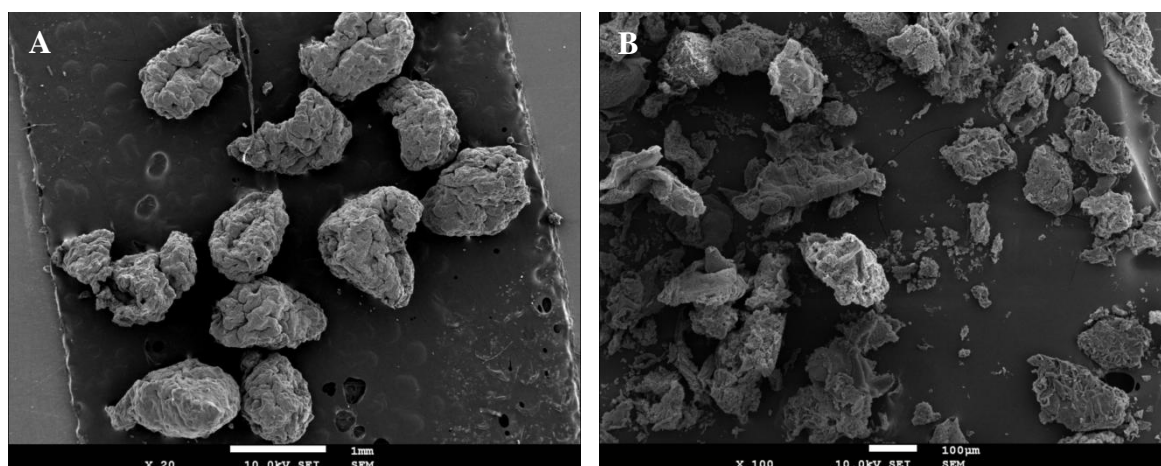


Figura 4.9 - A - Macropartículas; B- Micropartículas.

Na figura 4.9 – A, onde estão representadas as macropartículas, pode observar-se que as suas dimensões variam entre 1,0 mm e 1,5 mm. Na figura 4.9 – B estão representadas as micropartículas originadas após a acção do Ultra-Turrax. Como se pode verificar, as dimensões são bastante inferiores, encontrando-se entre 70 μm e 300 μm .

Dada a elevada hidrofiliicidade da goma de guar, é necessário reticular as micropartículas obtidas, tendo-se utilizado o glutaraldeído como agente reticulante.

4.2.3. Planeamento de Experiências

Neste estudo, devido à produção de micropartículas pelo método por precipitação ter sido mais eficaz, decidiu-se realizar o planeamento de experiências com o mesmo.

As variáveis dependentes utilizadas neste estudo, por se considerar que são as que mais influência terão sobre a liberação do fármaco, são as seguintes:

- Tamanho das micropartículas, uma vez que este parâmetro vai influenciar a velocidade de liberação do princípio activo;
- Percentagem de incorporação de fármaco, uma vez que para ocorrer liberação e se obterem os perfis de liberação desejados, é necessário maximizar esta variável;
- Grau de reticulação, uma vez que é a reacção de reticulação que vai reduzir a absorção de moléculas de água pelas micropartículas, evitando uma liberação precoce.

Como variáveis independentes foram escolhidas as três variáveis que mais influenciam as características das micropartículas:

- Concentração de goma de guar
- Volume de agente reticulante adicionado
- Tempo de reticulação

Os valores dos limites escolhidos para as variáveis independentes estão presentes na tabela 4.1. Foram também determinados os valores de α , sabendo que a distância entre o ponto zero e $\pm\alpha$ é 1,682^[59]

Tabela 4. 1 - Limites das variáveis independentes.

Variável independente	α_{inf}	Limite Mínimo	Limite médio	Limite máximo	α_{sup}
[GG] (%)	0,32	0,80	1,50	2,20	2,68
vA. Ret. (mL)	0,66	1,00	1,50	2,00	2,34
t Ret. (h)	27 min	10	24	38	47h33min

O planeamento de experiências seguido neste estudo encontra-se na tabela 4.2, onde se apresentam os valores utilizados para cada variável.

Tabela 4. 2 - Experiências realizadas e respectivas condições.

Experiência	[GG] (%)	v. A. Ret. (mL)	t. Ret. (h)
1	0,80	1,00	10
2	2,20	1,00	10
3	0,80	2,00	10
4	2,20	2,00	10
5	0,80	1,00	38
6	2,20	1,00	38
7	0,80	2,00	38
8	2,20	2,00	38
9	1,50	1,50	24
10	1,50	1,50	24
11	1,50	1,50	24
12	0,32	1,50	24
13	2,68	1,50	24
14	1,50	0,66	24
15	1,50	2,34	24
16	1,50	1,50	27 min
17	1,50	1,50	47h33min

Inicialmente, o objectivo era realizar as experiências apresentadas na tabela 4.2, caracterizar as micropartículas obtidas de modo a obter os resultados das variáveis dependentes e, por fim, otimizar o processo de produção recorrendo ao software MODDE 8. No entanto, no decorrer da caracterização das micropartículas verificou-se que alguns dos limites escolhidos para as variáveis independentes não foram os mais adequados, o que aliado à baixa incorporação de princípio activo obtida não permitiu proceder à optimização com o software MODDE 08. Assim, optou-se por comparar os resultados de experiências em que apenas uma das variáveis é modificada.

4.2.3.1. Caracterização morfológica

Apresentam-se em seguida as imagens de microscopia electrónica de varrimento obtidas para as experiências de 1 a 17. O fármaco modelo utilizado foi o Tegafur. Os valores dos intervalos e valores médios de tamanhos correspondentes a cada experiência encontram-se na tabela 4.1.

- **Experiência 1**

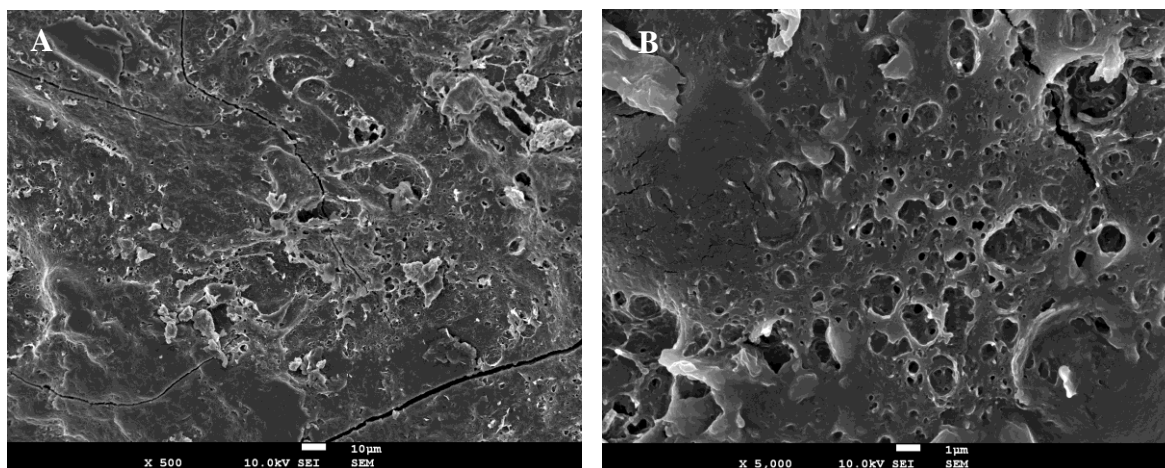


Figura 4. 10 - Resultados obtidos pela experiência 1.
A- Ampliação de 500 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes.

Em termos de morfologia macroscópica, esta experiência originou grandes agregados de polissacárido, o que pode ser comprovado nas figuras 4.10 – A e B. Como tal, esta experiência não conduziu aos resultados pretendidos. Na figura 4.10-B, pode-se observar uma estrutura do polissacárido praticamente homogénea. É de notar a presença de poros na superfície destes aglomerados.

• Experiência 2

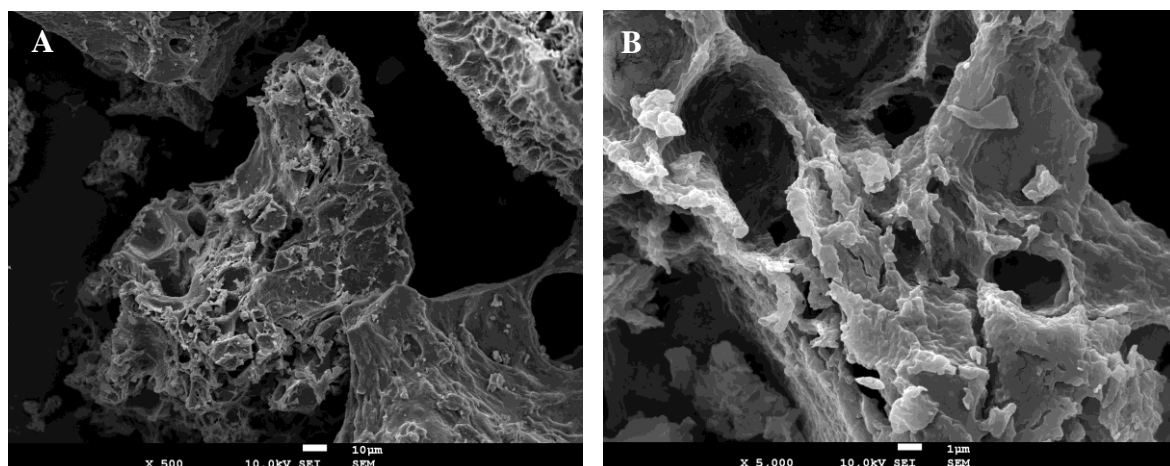


Figura 4. 11 - Resultados obtidos pela experiência 2.
A- Ampliação de 500 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes.

Tal como a experiência 1, esta experiência deu origem a grandes agregados de polissacárido. Como se pode ver nas figuras 4.11 – A e B, os aglomerados que se obtiveram apresentam alguma porosidade. Dado que os resultados obtidos pelas experiências 1 e 2 não são interessantes para este estudo, não vão ser realizados estudos adicionais.

• Experiência 3

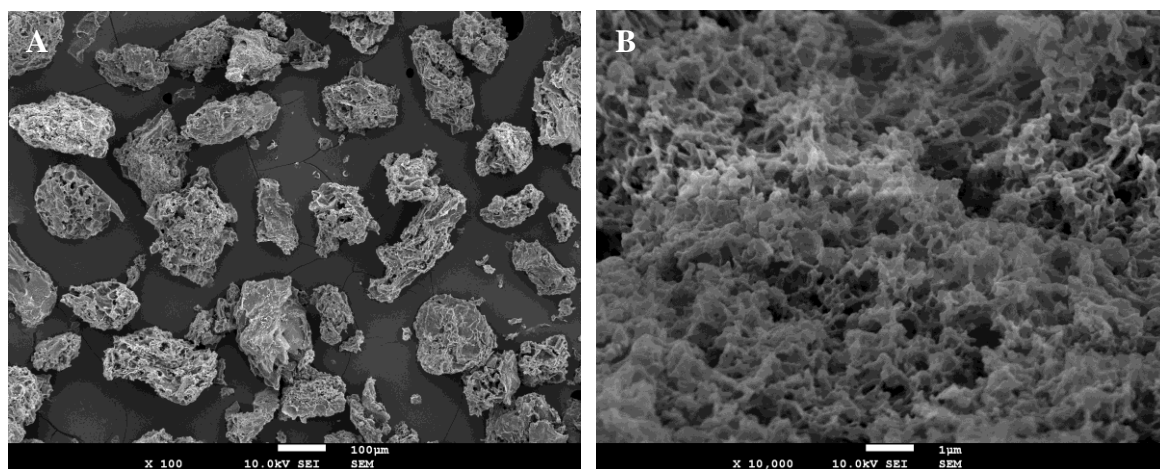


Figura 4. 12 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 3.
A- Ampliação de 100 vezes; B- Ampliação de 10.000 vezes.

Nesta experiência obtiveram-se micropartículas de formas irregulares, como se pode observar na figura 4.12 – A, com tamanhos que variam entre 62,5 μm e 287,0 μm , tendo um tamanho médio de 165,4 μm e um desvio padrão de 49,7 μm (Amostra com 52 micropartículas). As micropartículas obtidas por esta experiência apresentam uma superfície altamente porosa, como se pode observar na figura 4.12 – B.

- **Experiência 4**

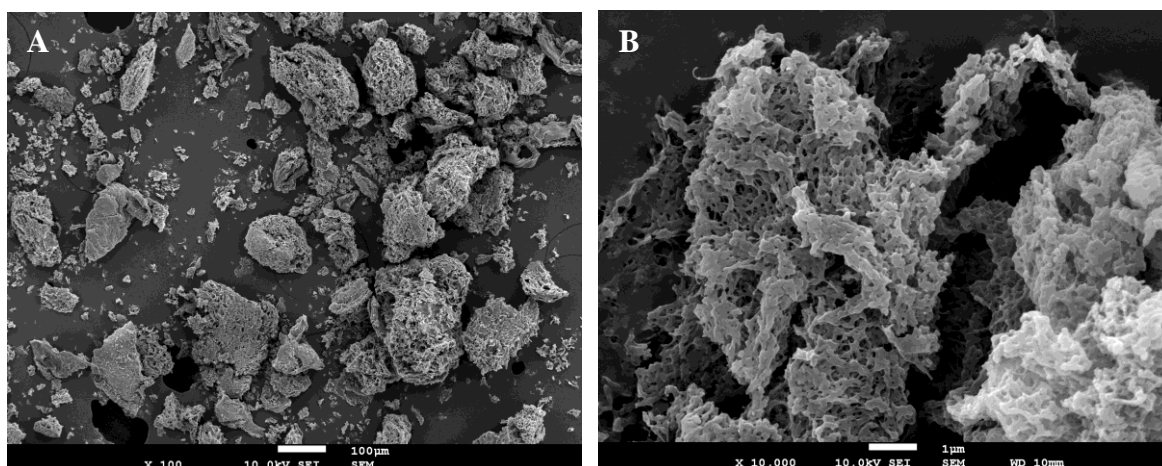


Figura 4. 13 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 4.
A- Ampliação de 100 vezes; B- Ampliação de 10.000 vezes.

Como se pode observar na figura 4.13 – A, foram obtidas micropartículas de formas irregulares, com tamanhos que variam entre 62,5 µm e 300,0 µm, tendo um tamanho médio de 149,7 µm e um desvio padrão de 61,1 µm (Amostra com 52 micropartículas). Observando a figura 4.13 – B, pode-se verificar que a superfície destas micropartículas apresentam alguma porosidade, havendo também zonas de alguma compactação.

- **Experiência 5**

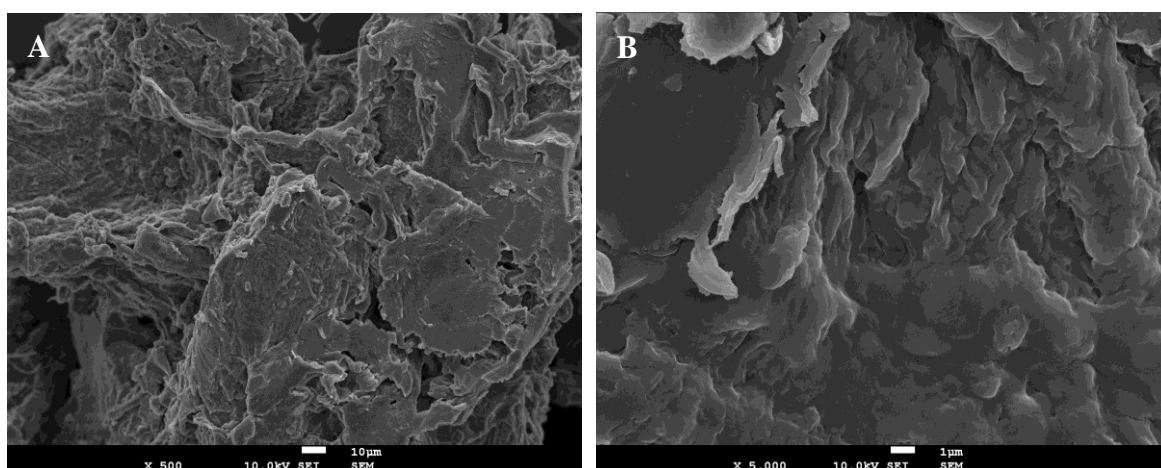


Figura 4. 14 - Resultados obtidos pela experiência 5.
A - Ampliação de 500 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes.

Esta experiência, à semelhança das experiências 1 e 2, não deu origem a micropartículas, mas sim a um grande agregado de polissacárido, conforme se pode ver nas figuras 4.14 – A e B. Como tal, esta experiência também não vai ser considerada para estudos futuros.

- **Experiência 6**

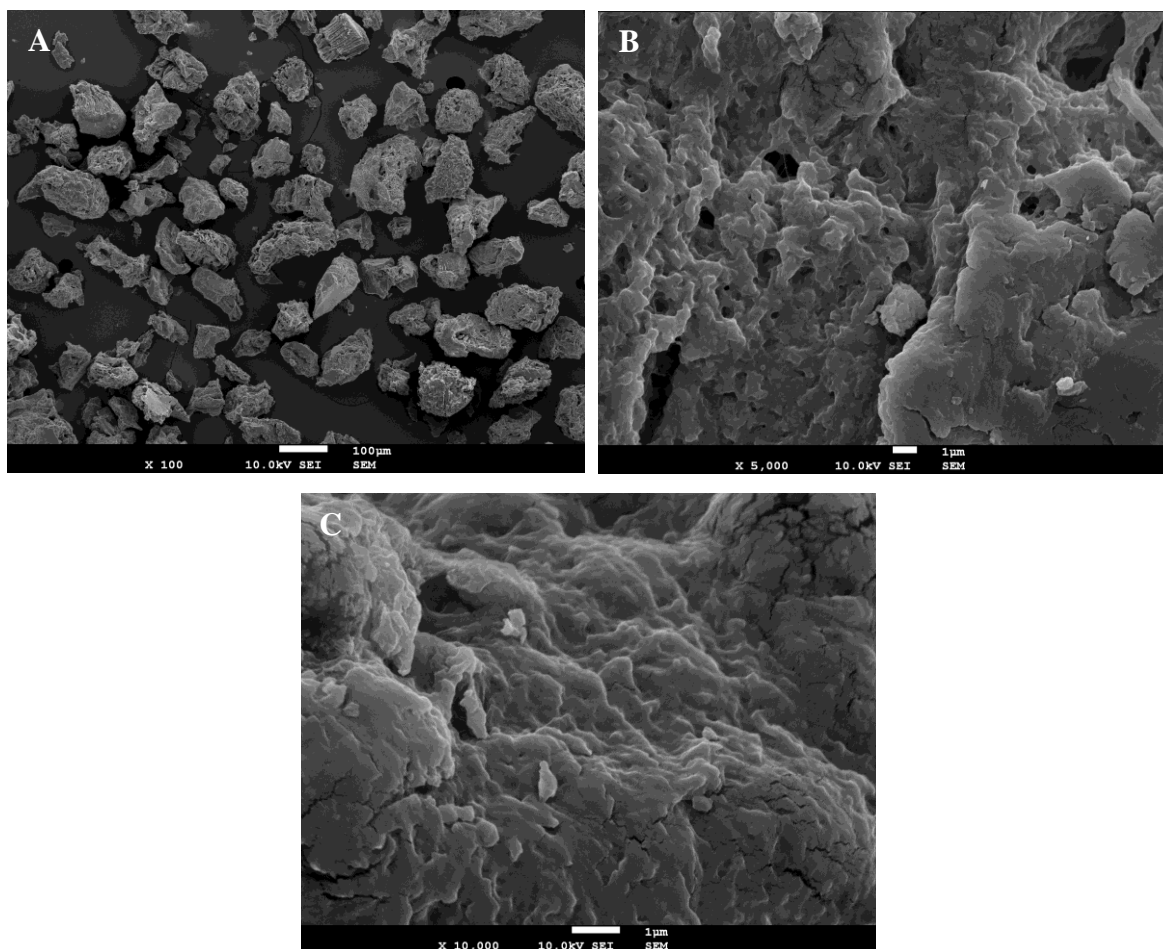


Figura 4. 15- Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 6.
A- Ampliação de 100 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes; C- Ampliação de 10.000 vezes.

De acordo com o que se pode observar na figura 4.15 – A, esta experiência originou micropartículas de formas irregulares, com tamanhos que variam entre 70,6 μm e 200,0 μm , obtendo-se um valor médio de 123,9 μm e um desvio padrão de 29,7 μm (Amostra com 52 micropartículas). Estas micropartículas apresentam uma superfície bastante compacta, como se pode observar nas figuras 4.15 – B e C.

- **Experiência 7**

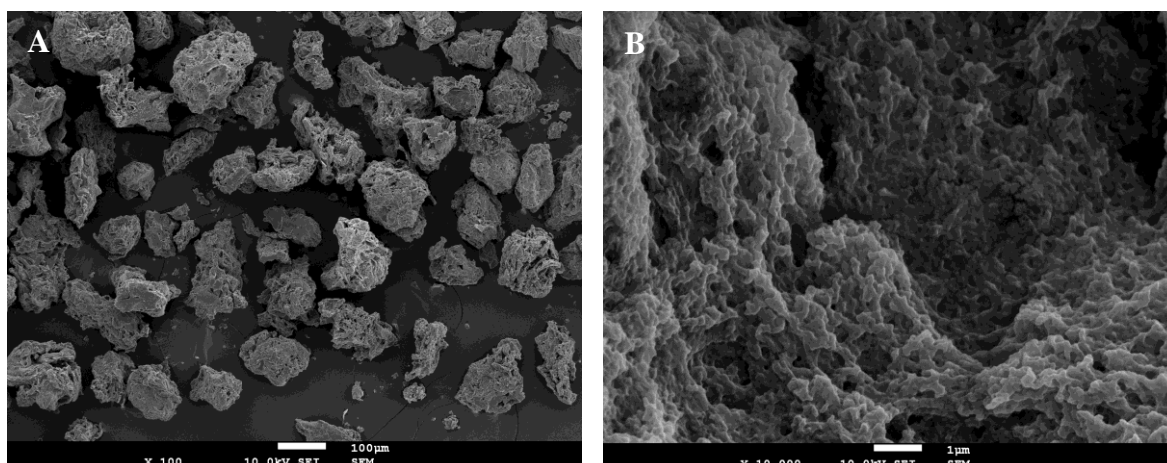


Figura 4. 16 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 7.
A- Ampliação de 100 vezes; B- Ampliação de 10.000 vezes.

Esta experiência deu origem a micropartículas de formas irregulares, como se pode observar na figura 4.16 – A, com dimensões que variam entre 58,8 μm e 260,0 μm , apresentando um tamanho médio de 150,7 μm e um desvio padrão de 47,6 μm (Amostra com 52 micropartículas). Na figura 4.16 – B é apresentada a superfície das micropartículas. Como se pode observar, embora se possa verificar alguma porosidade, a superfície das micropartículas apresenta uma grande compactação.

- **Experiência 8**

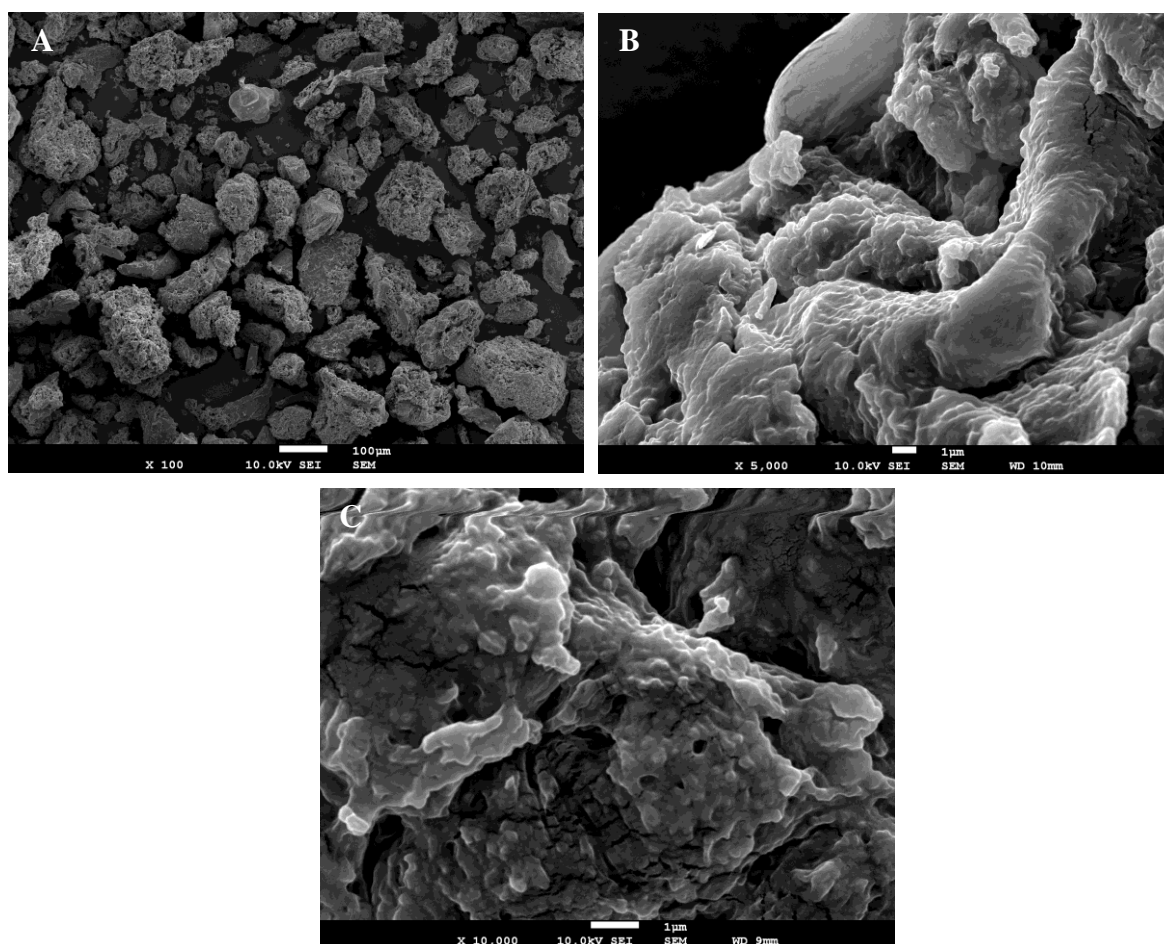


Figura 4.17 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 8.
A- Ampliação de 100 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes; C- Ampliação de 10.000 vezes.

Desta experiência resultaram micropartículas de formas irregulares, com tamanhos que variam entre 58,8 μm e 235,3 μm , tendo um valor médio de 136,3 μm e um desvio padrão de 41,6 μm (Amostra com 52 micropartículas). Nas figuras 4.17 – B e C pode observar-se a superfície das micropartículas, que apresenta uma grande compactação.

- **Experiências 9, 10 e 11**

As experiências 9, 10 e 11 constituem as experiências do ponto central.

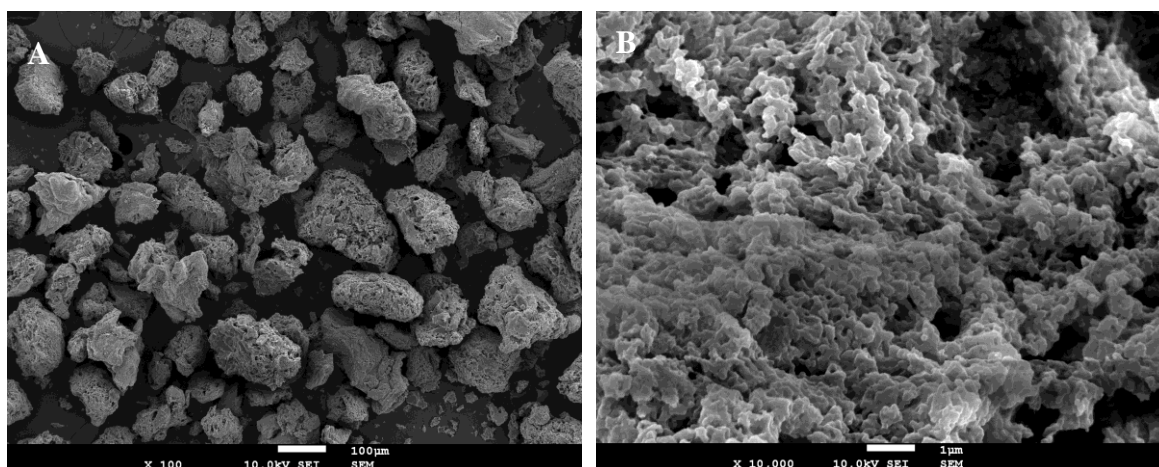


Figura 4. 18 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 9.
A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

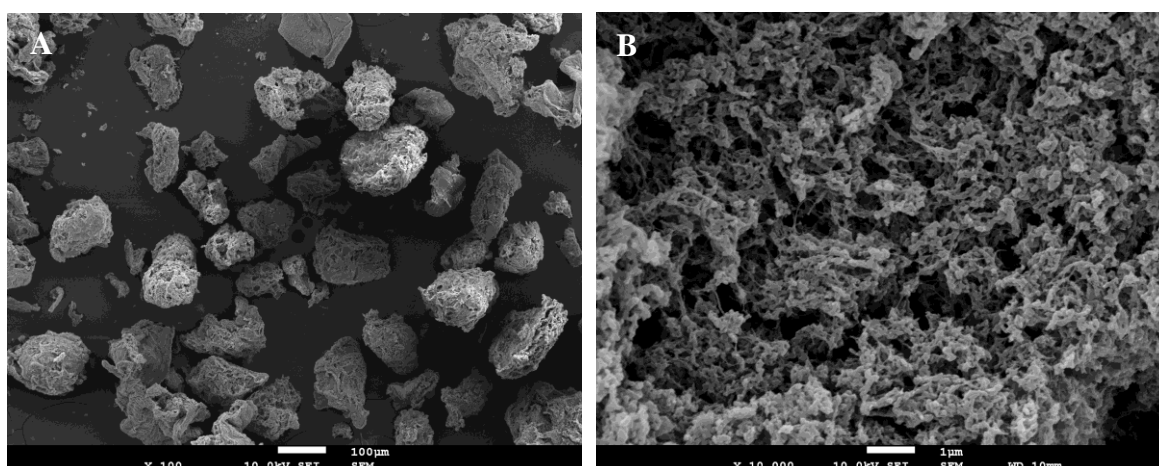


Figura 4. 19 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 10.
A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

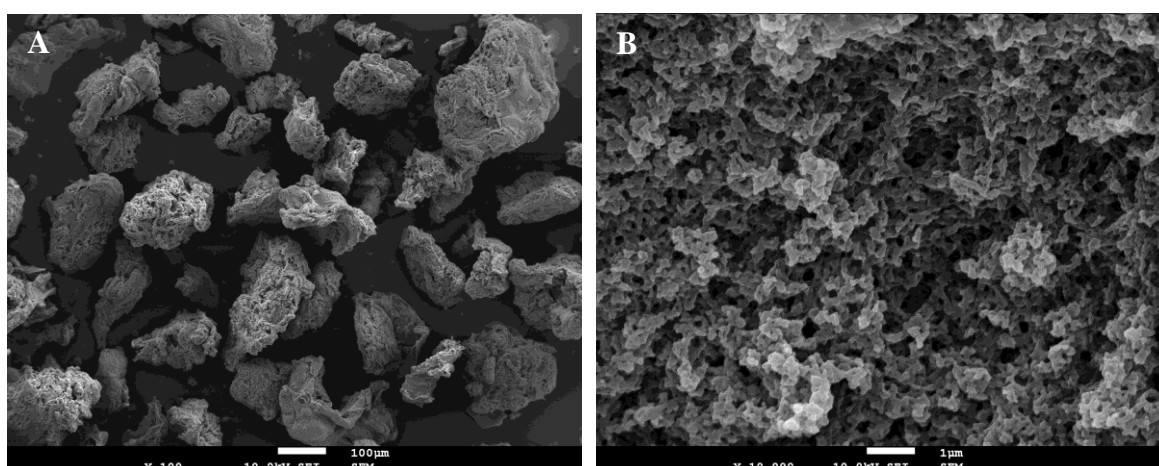


Figura 4. 20 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 11.
A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

Estas experiências originaram micropartículas de formas irregulares, como se pode observar nas figuras 4.18-A, 4.19-A e 4.20-A, com tamanhos que variam entre 58,8 μm e 306,3 μm , um valor médio de 142,7 μm e um desvio padrão de 49,9 μm (Amostra com 3x52 micropartículas). Como se pode observar nas imagens 4.18-B, 4.19-B e 4.20-B, as superfícies das micropartículas obtidas apresentam uma elevada porosidade, bastante semelhante nas três experiências.

- **Experiência 12**

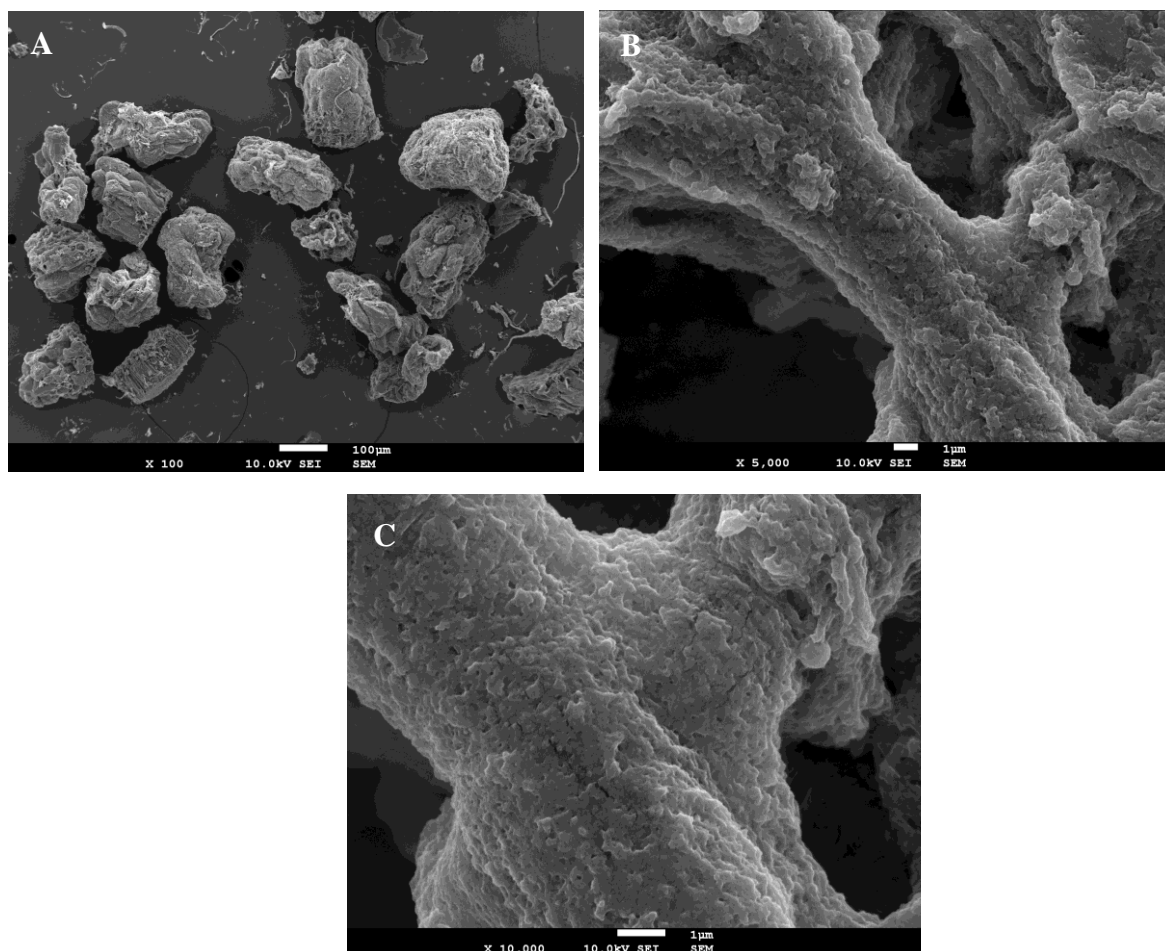


Figura 4. 21 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 12.

A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 5.000 vezes; C – Ampliação de 10.000 vezes.

Esta experiência originou micropartículas de formas irregulares, como se pode observar na figura 4.21 – A, com tamanhos que variam entre 105,0 μm e 300,0 μm , um valor médio de 189,7 μm e um desvio padrão de 69,0 μm (Amostra com 40 micropartículas). A superfície destas micropartículas é bastante compacta, como se pode observar nas figuras 4.21 – B e C.

• Experiência 13

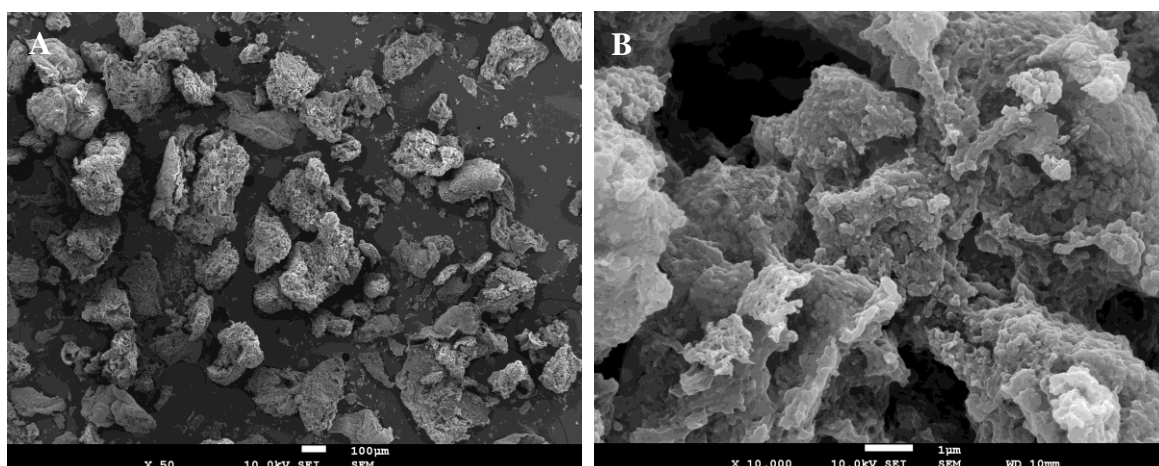


Figura 4. 22 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 13.
A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

As micropartículas obtidas apresentam formas irregulares, como se pode verificar na figura 4.22 – A, com dimensões que variam entre 70,6 μm e 470,8 μm , tendo um valor médio de 204,1 μm e um desvio padrão de 85,6 μm (Amostra com 52 micropartículas). De acordo com a figura 4.22 – B, estas micropartículas apresentam uma superfície compacta, na qual se observa uma porosidade bastante reduzida.

• Experiência 14

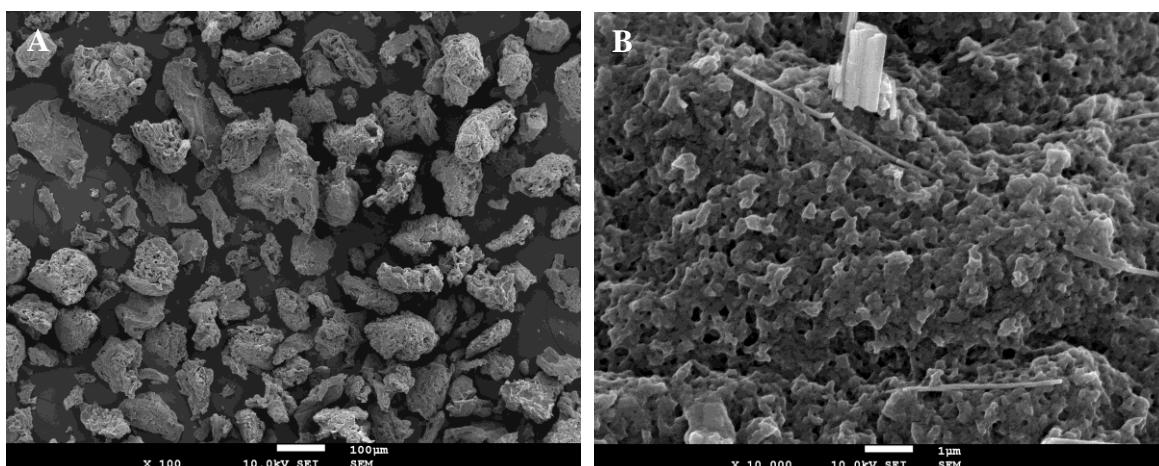


Figura 4. 23 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 14.
A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 10.000 vezes.

As micropartículas obtidas apresentam formas irregulares, como se pode observar na figura 4.23 – A, com tamanhos que variam entre 70,6 μm e 235,3 μm , tendo um valor médio de 132,4 μm e um desvio padrão de 33,5 μm (Amostra com 52 micropartículas). A superfície das micropartículas apresenta alguma porosidade, como se pode observar na figura 4.23 - B.

- **Experiência 15**

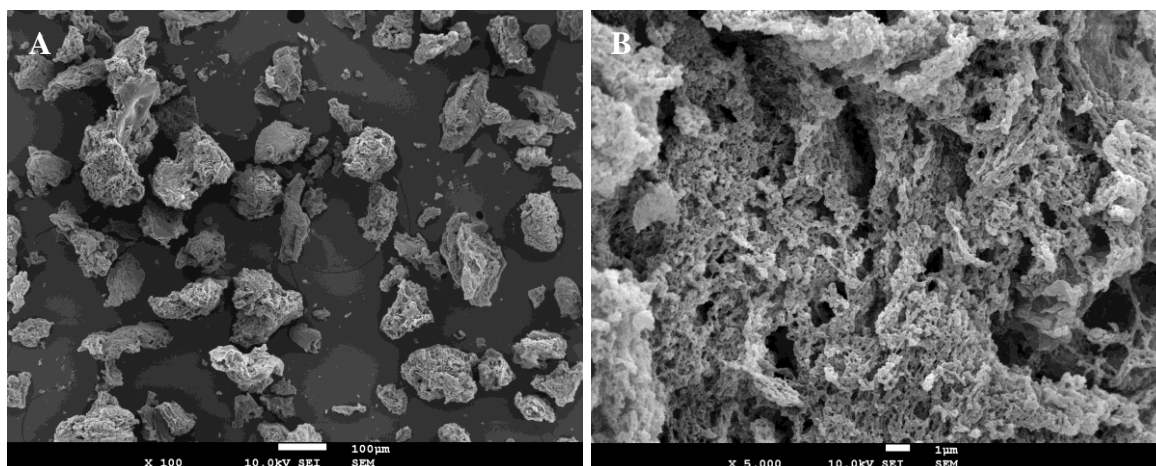


Figura 4. 24 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 15.
A - Ampliação de 100 vezes; B - Ampliação de 5.000 vezes.

As micropartículas obtidas apresentam formas irregulares, como se pode observar na figura 4.24-A, com dimensões que variam entre 58,8 μm e 182,4 μm , tendo um valor médio de 109,1 μm e um desvio padrão de 39,6 μm (Amostra com 52 micropartículas). Quanto à superfície das micropartículas, como se pode observar na figura 4.24-B, é notável uma grande porosidade.

- **Experiência 16**

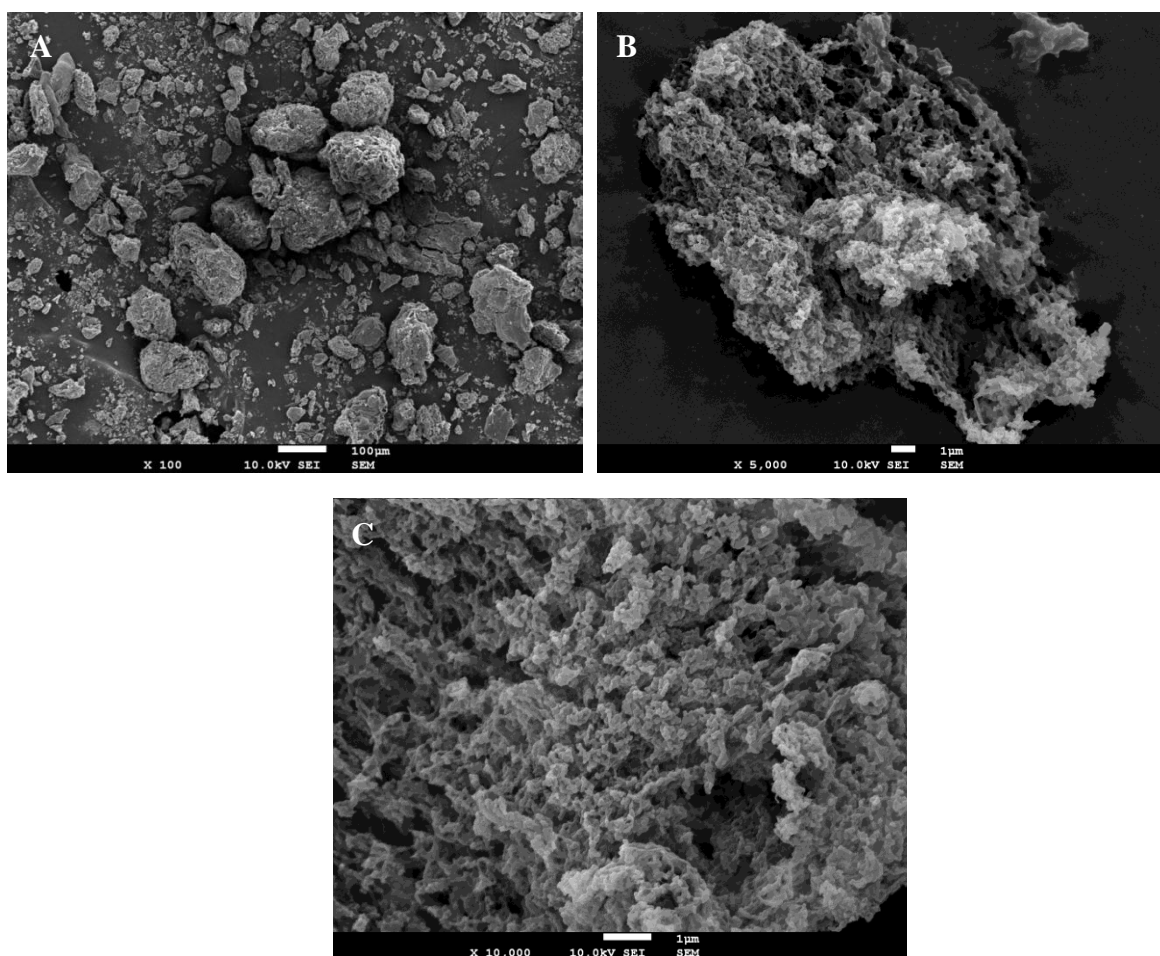


Figura 4. 25 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 16.

A- Ampliação de 100 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes; C- Ampliação de 10.000 vezes.

As micropartículas obtidas têm formas irregulares, como se pode observar na figura 4.25-A, com tamanhos que variam entre 40,0 μm e 305,0 μm , tendo um valor médio de 189,9 μm e um desvio padrão de 57,7 μm (Amostra com 52 micropartículas). A superfície das micropartículas apresenta uma grande porosidade, como se pode observar nas figuras 4.25- B e C.

- **Experiência 17**

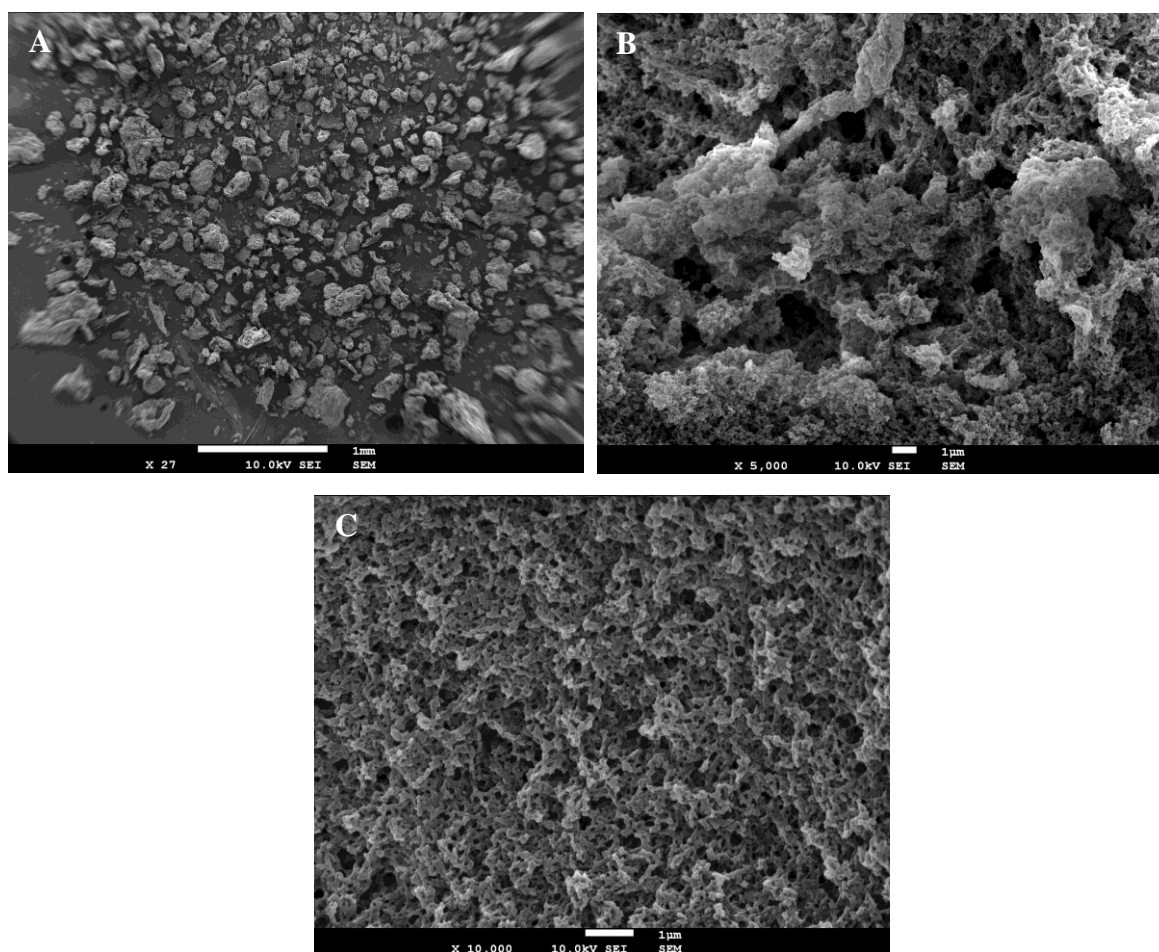


Figura 4. 26 - Imagens das micropartículas e respectiva superfície, obtidas pela experiência 17.
A- Ampliação de 27 vezes; B- Ampliação de 5.000 vezes; C- Ampliação de 10.000 vezes.

As micropartículas obtidas apresentam formas irregulares, como se pode observar na figura 4.26- A, com dimensões que variam entre 56,2 μm e 505,6 μm , tendo um valor médio de 157,9 μm e um desvio padrão de 50,9 μm (Amostra com 100 micropartículas). De acordo com as figuras 4.26- B e C, as micropartículas apresentam uma superfície bastante porosa.

Na tabela 4.3 encontram-se os valores dos intervalos de tamanhos e respectivos valores médios das 17 experiências realizadas. Os tamanhos foram determinados medindo-se o tamanho das micropartículas de duas imagens obtidas pelo microscópio electrónico de varrimento.

Tabela 4. 3- Intervalos e valores médios dos tamanhos das micropartículas do planeamento de experiências.

Experiência	Intervalo de tamanhos (μm)	Valor médio (μm)	Desvio Padrão (μm)
3	62,5 – 287,0	165,4	49,7
4	62,5 – 300,0	149,7	61,1
6	70,6 – 200,0	123,9	29,7
7	58,8 – 260,0	150,7	47,6
8	58,8 – 235,3	136,3	41,6
9, 10 e 11	58,8 – 306,3	142,7	49,9
12	105,0 – 300,0	189,7	69,0
13	70,6 – 470,8	204,1	85,6
14	70,6 – 235,3	132,4	33,5
15	58,8 – 182,4	109,1	39,6
16	40,0 – 305,0	189,9	57,7
17	56,2 – 505,6	157,9	50,9

As experiências 1, 2 e 5 não deram origem a micropartículas, mas sim a grandes agregados de polissacárido. O insucesso destas experiências pode ter sido devido aos valores reduzidos do tempo de reticulação (experiências 1 e 2), do volume de agente reticulado adicionado (experiências 1, 2 e 5) e à presença de uma quantidade residual de água nas micropartículas durante a secagem.

O volume de agente reticulante (glutaraldeído) adicionado pode ter sido insuficiente, ocorrendo, deste modo, uma diminuição pouco significativa na mobilidade das cadeias poliméricas das micropartículas, permitindo a entrada de moléculas de água. Por isso, nestas experiências é provável que as micropartículas tenham absorvido a água residual e consequentemente, ocorreu a sua agregação.

Por outro lado, um reduzido tempo de reticulação pode ter causado uma reacção incompleta. O tempo de reticulação pode não ter sido suficiente para as moléculas de glutaraldeído reagirem com os grupos hidroxilo, tornando a reacção de reticulação ineficaz.

Os resultados obtidos indicam que os limites mínimos do volume de glutaraldeído e tempo de reticulação escolhidos aquando do planeamento de experiências são demasiado baixos para o sistema em estudo.

As restantes experiências deram origem a micropartículas de formas irregulares, cujas superfícies apresentam uma porosidade variável com as condições experimentais. As mesmas vão ser analisadas de acordo com a influência das variáveis independentes nos seus tamanhos e porosidade.

i) Concentração de goma de guar

Comparando as micropartículas obtidas pelas experiências 3 (0,80 %) e 4 (2,20 %) em termos de tamanhos, pode-se verificar que apresentam intervalos bastante semelhantes e os valores médios e os desvios padrão não diferem significativamente. Quanto à sua morfologia externa, as micropartículas da experiência 4 apresentam uma menor porosidade que as da experiência 3.

Tendo em conta os tamanhos das micropartículas obtidas pelas experiências 7 (0,80 %) e 8 (2,20 %), pode-se observar que não há diferença significativa nos intervalos, no valores médios e nos desvios padrão. Quanto à sua morfologia externa, pode-se observar uma menor porosidade nas micropartículas da experiência 8 que nas da experiência 7.

As micropartículas obtidas pelas experiências 9, 10 e 11 (1,50 %), as três experiências do ponto central, morfologias externas bastante semelhantes, como seria de esperar.

As micropartículas obtidas pelas experiências 12 (0,32 %) apresentam uma menor dispersão de tamanhos e desvio padrão, e um valor médio semelhante às da experiência 13 (2,68 %). As micropartículas obtidas por ambas as experiências apresentam porosidades semelhantes.

Comparando a experiência 12 (0,32 %) com as experiências do ponto central (1,50 %), verifica-se que o valor médio e o desvio padrão é superior na experiência 12, assim como a porosidade superficial.

Comparando a experiência 13 (2,68 %) com as experiências do ponto central (1,50 %), é possível observar-se que a experiência 13 deu origem a micropartículas de maiores dimensões e com uma superfície mais compacta.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que, excepto para as concentrações de goma de guar iguais ou inferiores a 0,32 % (α_{inferior}) e iguais ou superiores a 2,68 % (α_{superior}), os tamanhos das micropartículas não são significativamente afectados por variações da concentração de goma de guar. Para concentrações muito elevadas de polissacárido, provavelmente as macropartículas são mais difíceis de destruir pelo Ultra-Turrax, dando origem a micropartículas de dimensões maiores. Para concentrações muito reduzidas, as gotas da solução de polissacárido apresentam uma reduzida viscosidade, desfazendo-se e coalescendo na solução 80/20 de acetona/água, formando um grande aglomerado. Como tal, é mais difícil destruir este aglomerado, originando micropartículas de maiores dimensões.

Também se pode concluir que a concentração de goma de guar afecta a porosidade das micropartículas, uma vez que se observa um aumento da porosidade com a diminuição da concentração da goma de guar. Este facto pode ser justificado, uma vez que quanto maior é a concentração de goma de guar na solução de polissacárido, maior será a sua viscosidade, havendo uma maior compactação do polissacárido. A experiência 12 (α_{inferior}) é a única que não está de acordo com o previsto, o que pode ser explicado pelo facto de a coalescência das macropartículas formar um aglomerado com uma maior viscosidade, dando origem a micropartículas com uma reduzida porosidade.

ii) Variação do volume de agente reticulante

Comparando as micropartículas obtidas pelas experiências 6 (1 mL) e 8 (2 mL), é possível observar-se que apresentam valores médios dos tamanhos que não diferem significativamente, embora as da experiência 6 apresentem uma menor dispersão de tamanhos, com um desvio padrão e um intervalo de tamanhos menores. As suas superfícies também são bastante semelhantes, apresentando uma grande compactação.

Comparando as micropartículas obtidas pelas experiências do ponto central (1,5 mL) com as da experiência 14 (0,66 mL), pode-se observar que não se verificam diferenças significativas na dispersão e valor médio de tamanhos das micropartículas nem na porosidade. Verifica-se que as micropartículas obtidas pela experiência 14 apresentam um desvio padrão ligeiramente inferior.

Comparando as micropartículas obtidas pelas experiências do ponto central (1,5 mL) com as da experiência 15 (2,34 mL), é observável uma diminuição do tamanho médio e desvio padrão nesta última, embora não significativas. Quanto à porosidade, é semelhante em ambos os casos.

Como tal, pode-se concluir que, para volumes de agente reticulante inferiores a 2,34 mL, não se verificam alterações significativas no tamanho das micropartículas. A partir deste valor, é observável uma ligeira diminuição no tamanho das micropartículas. Isto pode ser explicado pelo facto de, provavelmente as ligações formadas pela reacção de reticulação serem suficientes para compactar as micropartículas, causando uma ligeira diminuição de tamanho. Pode-se igualmente concluir que a porosidade em termos qualitativos não é afectada pelas variações no volume de agente reticulante adicionado.

iii) Variação do tempo de reticulação

Comparando as experiências 3 (10 horas) e 7 (38 horas), verifica-se que não há diferenças significativas no intervalo, valor médio e desvio padrão dos tamanhos das micropartículas obtidas por ambas as experiências. A porosidade nestas duas experiências é semelhante.

Comparando as experiências 4 (10 horas) e 8 (38 horas), verifica-se que não há diferenças significativas no intervalo e valor médio dos tamanhos das micropartículas obtidas por ambas as experiências. O desvio padrão apresenta valores ligeiramente superiores nas micropartículas obtidas pela experiência 4. Quanto à sua morfologia externa, as micropartículas obtidas pela experiência 8 apresentam uma superfície mais compacta que a experiência 4.

Comparando as micropartículas obtidas pelas experiências do ponto central (24 horas) com a experiência 16 (27 minutos), verifica-se que o intervalo de tamanhos e o desvio padrão não variam significativamente, embora a média das micropartículas da experiência 16 seja superior.

Comparando as experiências do ponto central (24 horas) e 17 (47 horas 33 minutos), verifica-se que não há alterações significativas na média dos tamanhos das micropartículas nem no seu desvio padrão. A porosidade é semelhante em ambas as experiências.

Comparando as micropartículas obtidas pelas experiências 16 e 17, não se observam diferenças significativas na porosidade ou desvio padrão, e observa-se um maior valor médio nas micropartículas obtidas pela experiência 16.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o tempo de reticulação não influencia significativamente o tamanho das micropartículas, excepto para um tempo de reticulação abaixo de 27 minutos, devendo-se ao facto de a reacção de reticulação ainda não se ter dado e, como tal, ainda não ter havido uma compressão das micropartículas. Não se verificaram alterações significativas na porosidade superficial das micropartículas com a variação do tempo de reticulação.

4.2.3.2. Medidas de porosidade

Através da observação das imagens de microscopia electrónica de varrimento das micropartículas do planeamento de experiências foi possível fazer-se uma avaliação qualitativa da porosidade. Como esta avaliação não é muito rigorosa, recorreu-se à medida da porosidade das micropartículas por ASAP, que permite a determinação da área superficial para estruturas micro (com poros menores que 2 nm) e mesoporosas (com poros entre 2 nm e 50 nm). Estruturas cujos poros têm dimensões são superiores a 50 nm são denominadas macroporosas e apenas podem ser analisadas pelo porosímetro por intrusão de mercúrio.

Os resultados obtidos pelo ASAP demonstram que este método não é eficaz para as micropartículas em estudo, dado que embora tenham micro e mesoporos são predominantemente macroporosas. Então, apenas se vai estudar a influência do volume de glutaraldeído na área superficial interna das micropartículas.

Na tabela 4.4 encontram-se os parâmetros de produção e os valores da área superficial interna para as experiências cujas micropartículas foram estudadas pela sua porosidade.

Tabela 4. 4 – Área superficial e volume total dos poros das micropartículas obtidas pelas experiências 10 e 19.

Experiência	[GG] (%)	V. Glutaraldeído (mL)	t. Reticulação (h)	Área Superficial (m ² /g)
10	1,50	1,50	24	27,08
19	1,50	3,50	24	61,96

A experiência 19 não consta do planeamento de experiências apresentado anteriormente e foi realizada para se poderem obter mais informações acerca da influência do volume de glutaraldeído em certas características das micropartículas.

Com o aumento do volume de glutaraldeído é esperada uma ligeira diminuição no tamanho das micropartículas pela formação das ligações de reticulação e, consequentemente, uma diminuição no tamanho dos seus poros. Com isto dá-se um aumento na área superficial interna das micropartículas.

Comparando a área superficial das micropartículas obtidas pelas experiências 10 (1,5 mL) e 19 (3,5 mL) verifica-se que esta é maior na experiência 19 evidenciando, de acordo com o esperado, a presença de poros mais pequenos. No entanto, para uma análise mais rigorosa, seria necessário fazer uma análise com o porosímetro por intrusão de mercúrio, para se obter informação acerca dos macroporos presentes nas micropartículas.

Através dos resultados obtidos pelo ASAP, foi possível determinar qual o ciclo de histerese que ocorre nas micropartículas.

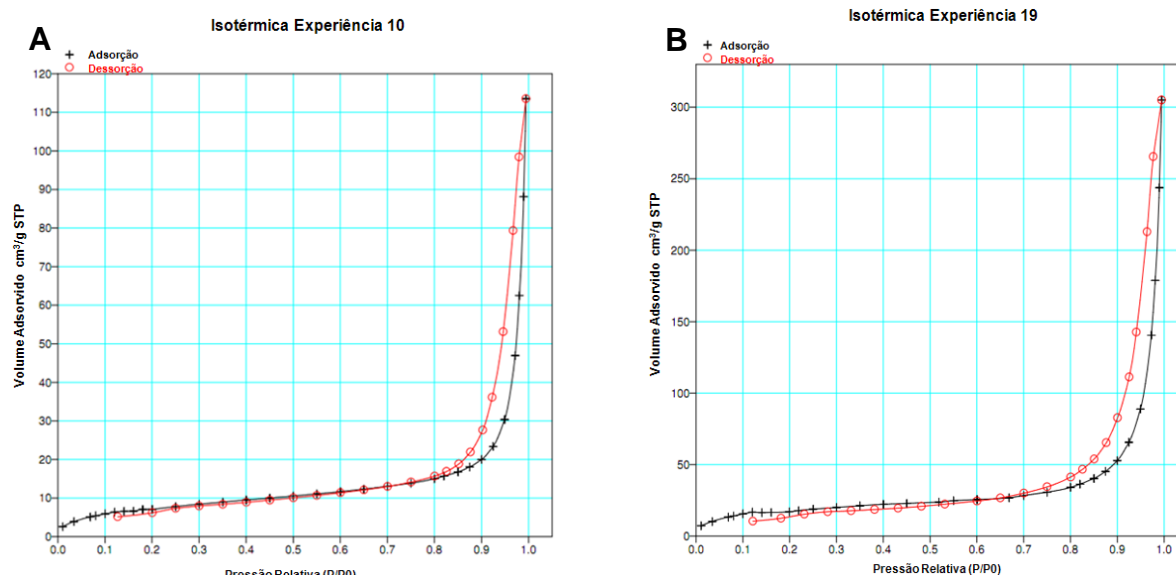


Figura 4. 27- Isotérmicas de adsorção e dessorção: A - Experiência 10; B - Experiência 19.

Na figura 4.27 estão representadas as isotérmicas de adsorção e dessorção. As micropartículas em estudo apresentam uma histerese do tipo H3, cujos ramos da isotérmica são assintóticos em relação à vertical $P/P_0=1$. Este tipo de histerese é característica de agregados não rígidos de partículas em forma de placa, com poros em fenda.^[67]

4.2.3.3. Estudos de capacidade de absorção de água

Com o objectivo de contornar o inconveniente da elevada hidrofiliabilidade da goma de guar, procedeu-se à reticulação química das micropartículas com glutaraldeído.

As moléculas de glutaraldeído reagem com os grupos hidroxilo da goma de guar, o que posteriormente limita a absorção de moléculas de água pela redução da flexibilidade das cadeias poliméricas. Assim, a capacidade de absorção de água pelas micropartículas é um indicador do grau de reticulação obtido. Inicialmente, algumas moléculas de água são absorvidas até as micropartículas atingirem um volume máximo. A partir deste último é atingido o equilíbrio, não ocorrendo a absorção adicional de moléculas de água. As micropartículas mantêm o seu estado de equilíbrio durante algum tempo e, posteriormente começam a degradar-se.

Para se determinar a absorção de água pelas micropartículas, efectuaram-se os respectivos ensaios, cujo procedimento foi mencionado no ponto 3.2.2.4, e foi determinado o grau de absorção de água, pela equação 4.1:

$$\alpha = \frac{W_g - W_0}{W_0} \times 100 \quad (4.1)$$

Em que W_0 é o peso das micropartículas liofilizadas e W_g é o peso das micropartículas em equilíbrio de absorção de água.

Para o estudo da capacidade de absorção de água pelas micropartículas, foram efectuadas mais duas experiências com volume de agente reticulante crescente, as experiências 18.3 e 19. Os parâmetros de produção de todas as experiências cujas micropartículas foram estudadas, assim como os respectivos graus de absorção de água encontram-se na tabela 4.5:

Tabela 4. 5 - Parâmetros de produção das micropartículas e respectivos graus de absorção de água.

Experiência	Concentração de goma de guar (%)	Volume de agente reticulante (mL)	Tempo de reticulação (h)	Grau de absorção de água (%)
3	0,80	2,00	10	240
4	2,20	2,00	10	250
6	2,20	1,00	38	108
7	0,80	2,00	38	106
8	2,20	2,00	38	263
9, 10 e 11	1,50	1,50	24	264±3
12	0,32	1,50	24	343
13	2,68	1,50	24	224
14	1,50	0,66	24	-46
15	1,50	2,34	24	234
16	1,50	1,50	27 min	-62
17	1,50	1,50	47 h 33	252
18.3	1,50	3,00	24	127
19	1,50	3,50	24	97

O equilíbrio de absorção de água pelas micropartículas foi observado ao fim de 7 horas de contacto, pelo que os restantes ensaios foram realizados com este tempo.

Os resultados são apresentados e analisados de acordo com as variações nos parâmetros de produção das experiências realizadas.

i) Variação da concentração de goma de guar

O efeito da variação da concentração da goma de guar no grau de absorção de água (indicador do grau de reticulação), vai ser analisado comparando as experiências 3 e 4; 7 e 8; 9, 10 e 11, 12 e 13.

Diferentes concentrações de polissacárido necessitam de diferentes volumes de agente reticulante. Quanto maior for a concentração do polissacárido, maior será o número de grupos hidroxilo disponíveis para reticulação. Então, um maior número de moléculas de agente reticulante será necessário para uma redução eficaz da mobilidade das cadeias do polissacárido. Como tal, para o mesmo volume de agente reticulante, é esperado que a reacção seja mais eficaz para concentrações de polissacárido menores e menos eficaz para concentrações de polissacárido maiores.

Comparando as experiências 3 (0,80 %) e 4 (2,20%) pode-se observar que a experiência 4 apresenta um maior grau de absorção de água. Estes resultados são concordantes com a suposição anterior, embora a diferença entre os graus de absorção de água não seja significativa. Como tal, é possível que a reacção de reticulação ainda não se tenha concluído.

Também uma maior capacidade de absorção de água é obtida com as micropartículas obtidas na experiência 8 (2,20 %) relativamente à experiência 7 (0,80 %). Estes resultados estão de acordo com a suposição anterior e a discrepância entre os graus de absorção de água poderá indicar que um tempo de reticulação de 38 horas permite que um maior número de moléculas de glutaraldeído reaja, sendo a reacção mais completa.

As experiências 9, 10 e 11 (1,50 %), cuja produção foi idêntica, apresentam uma capacidade de absorção de água idêntica, como seria de esperar.

Comparando as experiências 12 (0,32 %), 13 (2,68 %) e 9, 10 e 11 (1,50 %), pode-se observar que a experiência 12 obteve um grau de absorção de água bastante superior ao da experiência 13 e que as experiências 9, 10 e 11 apresentam um grau de absorção de água que se encontra entre os das experiências 12 e 13. O facto de o grau de absorção de água aumentar com a diminuição da concentração da goma de guar pode indicar que a reacção não está completa ao fim de 24 horas.

ii) **Variação do volume de agente reticulante adicionado**

O efeito da variação do volume de agente reticulante sobre o grau de absorção de água vai ser analisado comparando as experiências 6 e 8; e 9, 10 e 11, 14, 15, 18.3 e 19.

O glutaraldeído reage com os grupos hidroxilo do polissacárido, diminuindo o acesso a moléculas de água. Deste modo é minimizado o aumento de volume das micropartículas em contacto com moléculas de água.^[13] Como tal, um aumento no volume de agente reticulante adicionado vai resultar num maior número de moléculas disponíveis para reacção com os grupos hidroxilo e, consequentemente, numa redução da capacidade de absorção de água pelas micropartículas.

Comparando as experiências 6 (1,00 mL) e 8 (2,00 mL), observa-se que os resultados obtidos não estão de acordo com o esperado. Isto pode ser devido ao facto de o volume de glutaraldeído adicionado não ser suficiente para uma reticulação eficaz que assegura a integridade das micropartículas em meio neutro/básico. Por isso, pode ter ocorrido a dissolução de parte das cadeias do polissacárido, tendo estas sido removidas no processo de filtração, causando uma diminuição na massa das micropartículas. Anteriormente, referiu-se que as experiências 1 e 2, com o mesmo volume de glutaraldeído adicionado, não deram origem a micropartículas, por este ser insuficiente.

Comparando as experiências 9, 10 e 11, 14, 15, 18.3 e 19, pode-se observar que um aumento no volume de glutaraldeído adicionado causa uma diminuição na capacidade de absorção de fluidos pelas micropartículas, como seria de esperar.

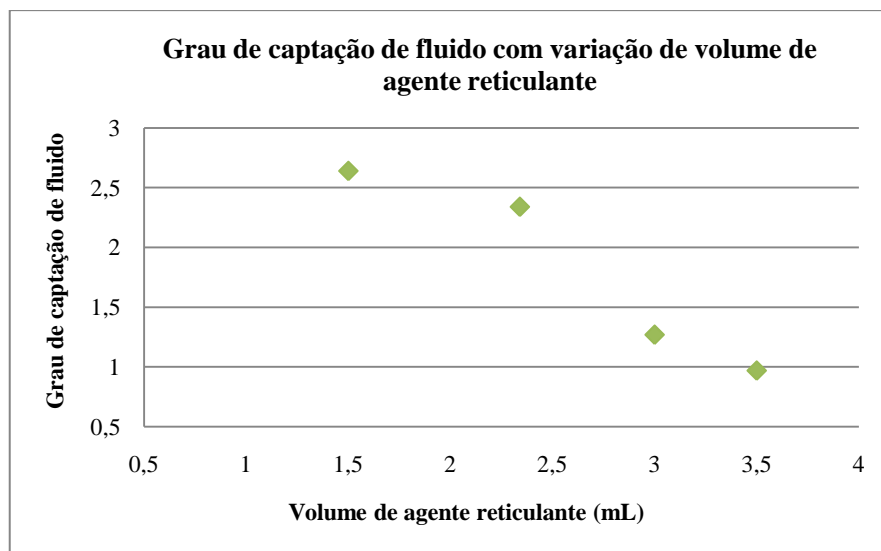


Figura 4. 28 - Variação do grau de absorção de água com a variação do volume de agente reticulante adicionado.

Na figura 4.28 pode observar-se uma diminuição do grau de absorção de água com o aumento do volume de glutaraldeído adicionado, o que indica que a reticulação é mais eficaz para volumes de glutaraldeído adicionados superiores a 2,5 mL.

O valor negativo obtido na experiência 14 pode ser explicado pelo facto de o volume de agente reticulante adicionado ser muito baixo e no decorrer do ensaio de absorção de água ter ocorrido a dissolução de parte do polissacárido na solução PBS pH=7.4, o que deu origem à perda de massa verificada.

iii) Variação do tempo de reticulação

O efeito da variação do tempo de reticulação no grau de absorção de água vai ser analisado comparando as experiências 3 e 7; 4 e 8; 9, 10 e 11, 16 e 17.

A reacção completa entre as moléculas de glutaraldeído e os grupos hidroxilo do polissacárido necessita de um determinado tempo. Para um tempo inferior ao necessário, é esperado que a reacção não se dê por completo. Quanto menor for o número destas moléculas a reagir, menor será a diminuição na mobilidade das cadeias do polissacárido, tornando as micropartículas mais susceptíveis à absorção da água.

Comparando as experiências 3 (10 horas) e 7 (38 horas), pode-se observar que esta última apresenta um menor grau de absorção de água, o que indica uma reacção de reticulação mais eficaz, de acordo com o esperado.

Comparando as experiências 4 (10 horas) e 8 (38 horas), verifica-se que o valor do grau de absorção de água é superior nas micropartículas obtidas pela experiência 8, embora a diferença entre os valores obtidos pelas duas experiências não seja significativa. Estes resultados não estão de acordo com o esperado.

Comparando as experiências 9, 10 e 11 (24 horas) com a experiência 17 (47 horas e 33 minutos), verifica-se que nesta última o grau de absorção de água obtido é inferior ao das experiências 9, 10 e 11. O facto de o grau de absorção de água diminuir com o tempo de reticulação indica o aumento da eficiência de reticulação com o tempo como o esperado, uma vez que os grupos hidroxilo têm mais tempo para reagir com as moléculas de glutaraldeído. Indica ainda que a reacção de reticulação não está completa ao fim de 24 horas.

As micropartículas obtidas pela experiência 16 (27 minutos) obtiveram um grau de absorção de água negativo. Isto poderá indicar que este tempo é insuficiente para se dar a reacção de reticulação, não adquirindo as micropartículas integridade para se manterem em solução aquosa. Como tal, as mesmas são destruídas mais facilmente e dissolvem-se na solução PBS 7.4, originando uma grande perda de massa.

4.2.3.4. Estrutura química das micropartículas

A estrutura química das micropartículas foi determinada por FT-IR, em comparação com a estrutura química dos seus constituintes isolados, a goma de guar e o tegafur.

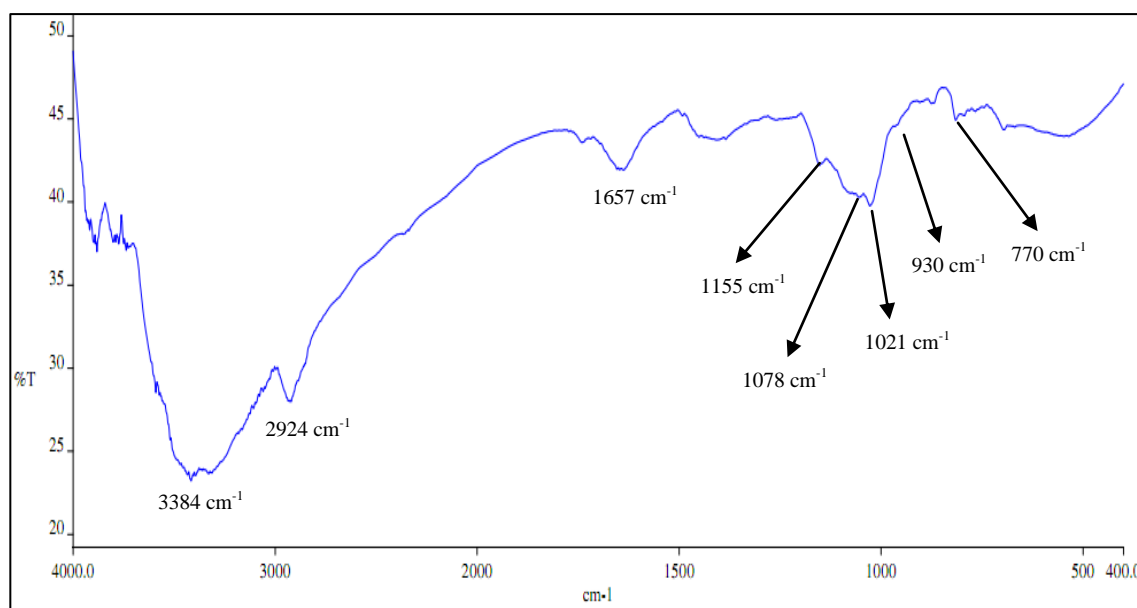


Figura 4. 29 - Espectro de FT-IR da goma de guar.

As principais bandas presentes no espectro da goma de guar^{[63][64]}, que se encontra na figura 4.29, são as seguintes:

- 3384 cm⁻¹, que representa o alongamento das ligações O-H;
- 2924 cm⁻¹, que representa o alongamento das ligações C-H dos grupos metileno;
- 1657 cm⁻¹, que representa alongamento dos anéis de galactose e manose;
- 1155 cm⁻¹ e 1078 cm⁻¹, que representam o alongamento dos grupos C-OH e -CH₂OH;
- 1021 cm⁻¹, que representa a torção dos grupos metileno;
- 930 cm⁻¹, que representa o alongamento da ligação (1-4) da galactose-manose;
- 770 cm⁻¹, que representa o alongamento da ligação (1-6) da galactose-manose.

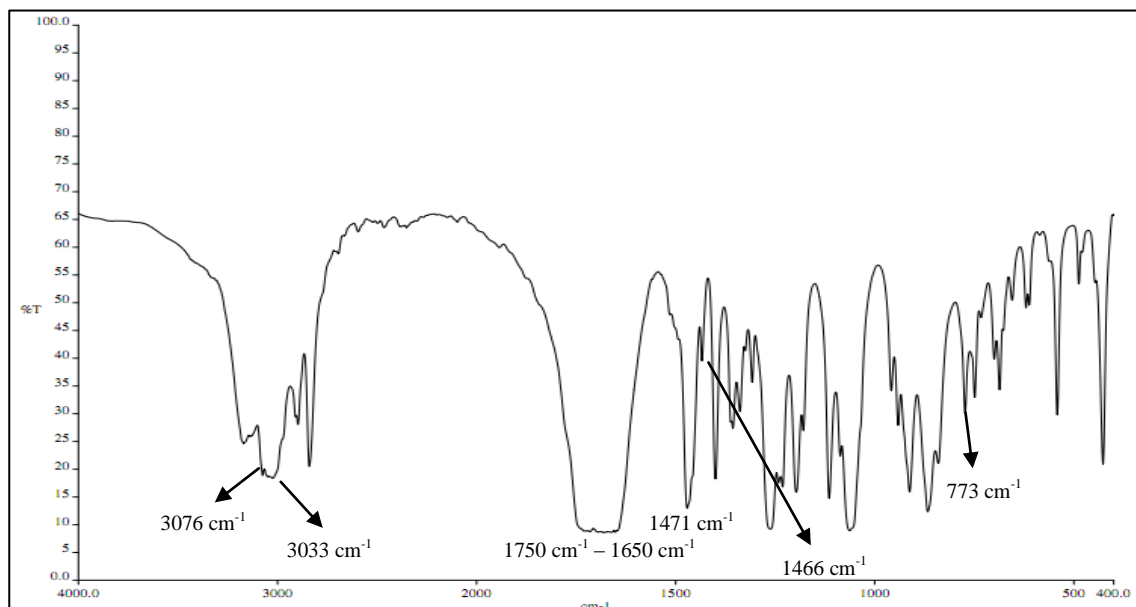


Figura 4. 30 – Espectro de FT-IR do Tegafur.

As principais bandas presentes no espectro do Tegafur^[65], que se encontra na figura 4.30, são as seguintes:

- 3076 cm^{-1} , que representa o alongamento das ligações C-H;
- 3033 cm^{-1} , que representa o alongamento simétrico e assimétrico das ligações C-H dos grupos metileno;
- Entre 1750 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , que representa o alongamento das ligações (C=O);
- 1471 cm^{-1} e 1466 cm^{-1} , que representam o desdobramento angular dos grupos metileno;
- 773 cm^{-1} , que representa a flexão dentro do plano das ligações (C-C-N) e (C-N-C) e o alongamento da ligação F-C.

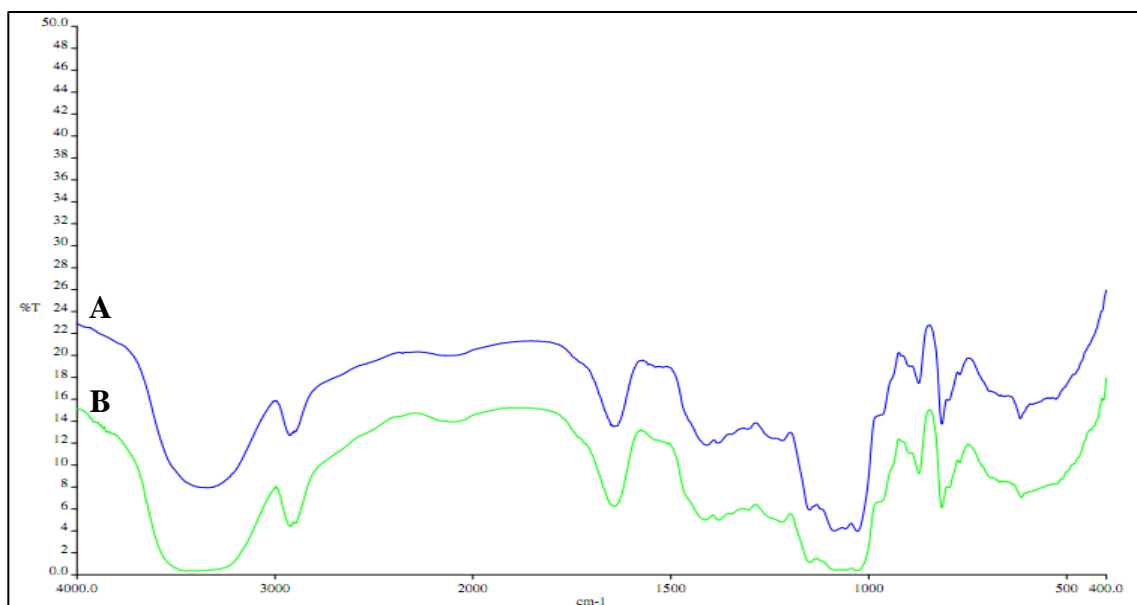


Figura 4. 31 - Espectro de FTIR das micropartículas obtidas pela experiência 9 (A) e 11 (B).

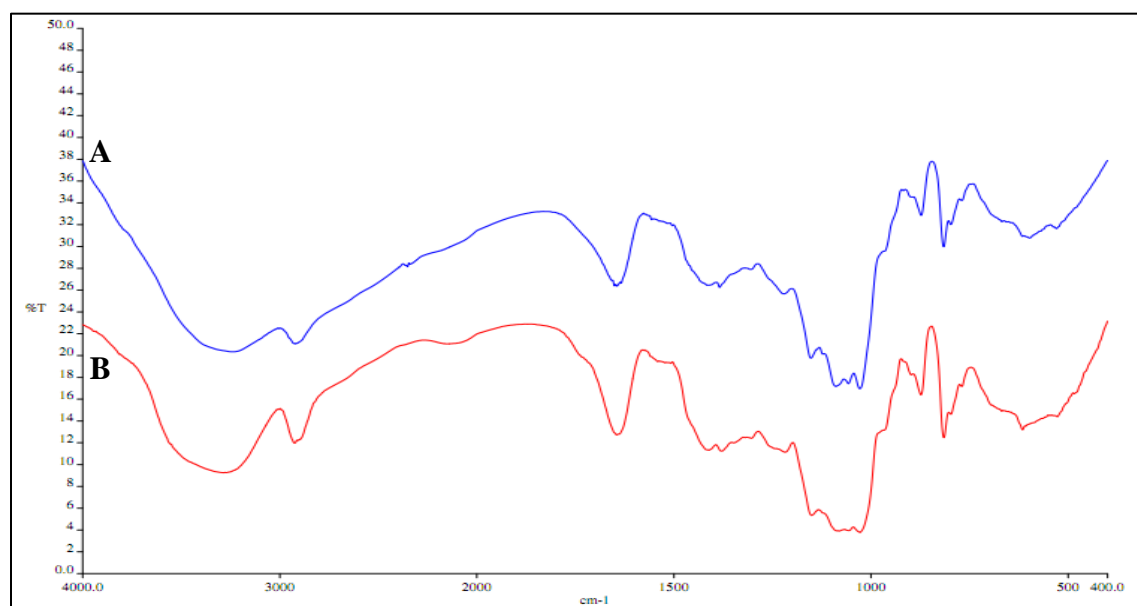


Figura 4. 32 - Espectros de FT-IR das micropartículas obtidas pela experiência 12 (A) e 13 (B).

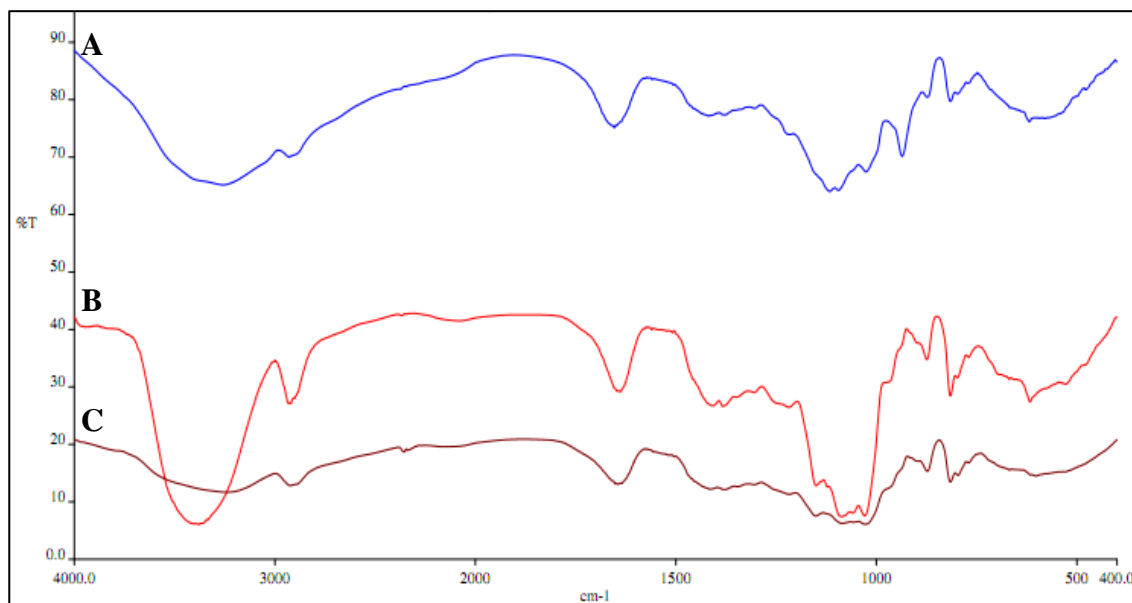


Figura 4. 33 - Espectros de FT-IR das micropartículas obtidas pela experiência 14 (A), 15 (B) e 19 (C).

Observando os espectros que se encontram nas figuras 4.31, 4.32 e 4.33, é possível verificar que as micropartículas obtidas pelas experiências 9, 11, 12, 13, 14, 15, (experiências do método do composto central) e experiência 19 (com os valores médios da concentração de goma de guar e tempo de reticulação e com 3 mL de glutaraldeído adicionado) apresentam as mesmas bandas que as da goma de guar, que se encontram na figura 4.29. Os espectros destas experiências são bastante semelhantes. Não se observam as bandas características do Tegafur, presentes na figura 4.30, nos espectros das micropartículas, o que poderá indicar uma eficiência de encapsulação reduzida.

Além das bandas características da goma de guar, os espectros de todas as micropartículas apresentam uma banda adicional, a cerca de 1230 cm^{-1} . Como foi referido anteriormente, as moléculas de glutaraldeído reagem com os grupos hidroxilo de goma de guar, dando origem a ligações éter e este pico adicional diz respeito a este tipo de ligações, comprovando a presença das ligações de reticulação nas micropartículas. Kumar *et al.* efectuaram o estudo de micropartículas de goma de guar reticuladas com glutaraldeído e fizeram o espectro de FT-IR da goma de guar e micropartículas reticuladas, observando a presença de uma banda a 1246 cm^{-1} , que se deve às ligações éter formadas pela reacção de reticulação.^[66]

4.2.3.5. Ensaios de Libertação

Foram efectuados ensaios de libertação às micropartículas obtidas pelas experiências do planeamento anteriormente referido, para determinar os respectivos perfis de libertação.

Na tabela 4.6 são apresentadas a massa total de princípio activo libertada nos ensaios em meio ácido e em meio PBS pH = 7.4.

Tabela 4. 6 - Massa de princípio activo libertada em meio ácido e PBS, nas micropartículas do planeamento de experiências.

Experiência	Massa de fármaco libertada em meio ácido (mg)	Massa de fármaco libertada em meio PBS (mg)
3	0,089	0,029
4	0,029	0,006
6	0,031	0,035
7	0,035	0,025
8	0,033	0,056
9	0,004	0,007
10	0,004	0,018
11	0,022	0,020
12	0,008	0,014
13	0,009	0,018
14	0,011	0,016
15	0,010	0,011
16	0,003	0,033
17	0,007	0,026

De acordo com os valores apresentados na tabela 4.6, pode-se verificar que a massa de princípio activo libertada é muito baixa, o que poderá indicar uma eficiência de encapsulação bastante reduzida.

Durante o processo de produção das micropartículas, há várias etapas que poderão estar na origem da perda do princípio activo, as quais são apresentadas em seguida:

- 1) No contacto da solução de polissacárido contendo o princípio activo com a solução 80/20 de acetona/água pode ter ocorrido a dissolução da água e fármaco nela dissolvido na solução de acetona/água, durante todo o tempo que antecede a acção do Ultra-Turrax;
- 2) Aplicação do Ultra-Turrax para a diminuição do tamanho das micropartículas. Neste caso, o fármaco que fica à superfície das novas micropartículas poderá ser removido para a solução de acetona/água;
- 3) Perda do princípio activo para a solução de acetona/água durante o processo de reticulação.

O facto de o Tegafur ser um princípio activo de reduzido peso molecular e com alguma solubilidade em fase aquosa também pode ter contribuído para a grande perda observada. A eficiência de encapsulação de princípios activos de pesos moleculares reduzidos, reportada na literatura, é bastante baixa (1%-5%) comparativamente à dos princípios activos de elevados pesos moleculares.

A experiência que se aproximou mais dos resultados pretendidos, mesmo tendo libertado uma massa de princípio activo reduzida, foi a experiência 8. Os perfis de libertação correspondentes a esta experiência encontram-se na figura 4.34.

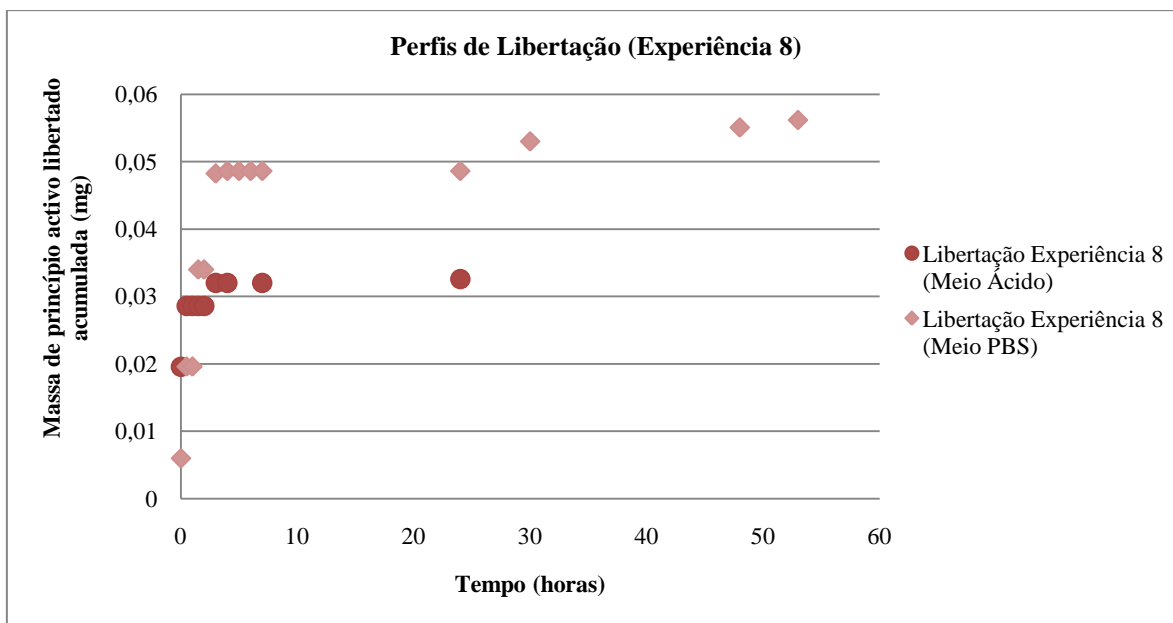


Figura 4. 34 – Perfis de libertação obtidos pela experiência 8.

Observando os perfis de libertação desta experiência é possível comprovar que a massa de princípio activo libertada em meio ácido é menor que a libertada em meio PBS.

Em meio ácido verifica-se uma libertação inicial elevada (“burst effect”), o que poderá ser justificado pela presença de uma certa quantidade de princípio activo à superfície das micropartículas ou na proximidade desta, tendo sido logo libertado. A partir das três horas não se verifica qualquer libertação. Em meio PBS pH=7.4, a percentagem de libertação aumenta com o tempo do ensaio até cerca das 4 horas. A partir de 4 horas a libertação é mais lenta.

4.2.4. *Determinação da perda de princípio activo no processo de produção*

Como foi referido anteriormente, os resultados obtidos nos ensaios de libertação indicam uma reduzida eficiência de encapsulação, que pode ser explicada pela perda do princípio activo nas etapas do contacto da solução de polissacárido com a solução de acetona/água, na acção do Ultra-Turrax e no processo de reticulação.

De modo a identificar a origem da perda do princípio activo no processo de produção, foram realizadas quatro experiências, cujos parâmetros de produção são apresentados na tabela 4.7:

Tabela 4. 7 - Experiências para determinar a origem da perda de princípio activo no processo de produção.

Experiência	Concentração de goma de guar (%)	Volume de agente reticulante (mL)	Tempo de reticulação (horas)	Ultra-Turrax
18.1	1,50	3,00	24	Não
18.2	1,50	-	-	Não
18.3	1,50	3,00	24	Sim
18.4	1,50	-	-	Sim

A solução 80/20 de acetona/água utilizada no processo foi removida das macro/micropartículas no processo de lavagem destas e colectada para posterior quantificação do princípio activo dissolvido, por HPLC. Procedeu-se também à quantificação do princípio activo presente nas partículas.

Na tabela 4.8, estão presentes os valores da percentagem de eficiência de encapsulação do princípio activo nas partículas:

Tabela 4. 8 - Eficiência de encapsulação nas experiências 18.1, 18.2, 18.3 e 18.4.

Experiência	Eficiência de Encapsulação (%)
18.1	0,39
18.2	1,21
18.3	0
18.4	0,45

De acordo com os resultados presentes na tabela 4.8, comparando as eficiências de encapsulação das micropartículas sem (18.1 e 18.2) e com a acção do Ultra-Turrax (18.3 e 18.4), pode-se verificar que a eficiência de encapsulação do princípio activo é maior nas partículas que não sofreram a acção do Ultra-Turrax. Comparando as partículas reticuladas (experiências 18.1 e 18.3) com as partículas não reticuladas (experiências 18.2 e 18.4), pode-se verificar uma maior eficiência de encapsulação em partículas não reticuladas. Uma vez que estas partículas não são submetidas à reacção de reticulação, não estão tanto tempo em contacto com a solução de acetona/água, o que pode explicar a menor perda de princípio activo.

Com a análise dos sobrenadantes das experiências colectados, verificou-se que uma grande parte do princípio activo é perdido na etapa da adição da solução do polissacárido à solução de acetona/água, devido ao seu baixo peso molecular e à sua solubilidade nesta solução.

4.2.5. *Produção de macropartículas*

Tendo em conta os resultados obtidos, nos quais se observou uma baixa eficiência de encapsulação, decidiu-se alterar as condições de produção das partículas, com o objectivo de obter uma maior eficiência de encapsulação e os perfis de libertação pretendidos. Utilizaram-se as condições experimentais utilizadas na experiência 8, por ter apresentado perfis de libertação mais próximos do pretendido. Essas alterações são as seguintes:

- Adição de um outro princípio activo na solução inicial do polissacárido, o 5-Fluorouracil (Experiência 20). O objectivo deste passo é estudar a eficiência de encapsulação para outros princípios activos;
- Produção de macropartículas vazias, que posteriormente são imersas em 10 mL de uma solução 5 mg/mL dos fármacos 5-Fluorouracil (Experiência 21) e Tegafur (Experiência 22) durante 6 horas. O objectivo deste ponto é utilizar as propriedades hidrofílicas das macropartículas para a encapsulação do princípio activo.
- Produção de macropartículas, suprimindo-se a utilização do Ultra-Turrax;

No que diz respeito à experiência 20 (Matriz polimérica com 5-FU), foram obtidos os perfis de libertação que se encontram na figura 4.35.

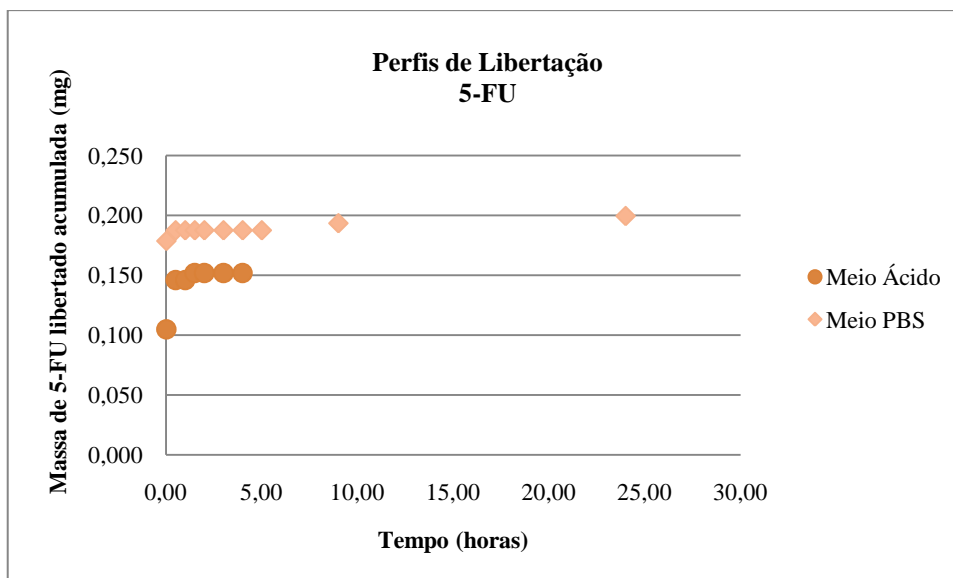


Figura 4. 35 - Perfis de libertação das macropartículas obtidas pela experiência 20 (Matriz polimérica com 5-FU).

Como se pode verificar, há uma pequena diferença entre a massa de 5-FU libertada em meio ácido e em meio PBS. Verifica-se ainda que a quantidade máxima de fármaco libertada é atingida ao fim de 1 hora para qualquer um dos meios.

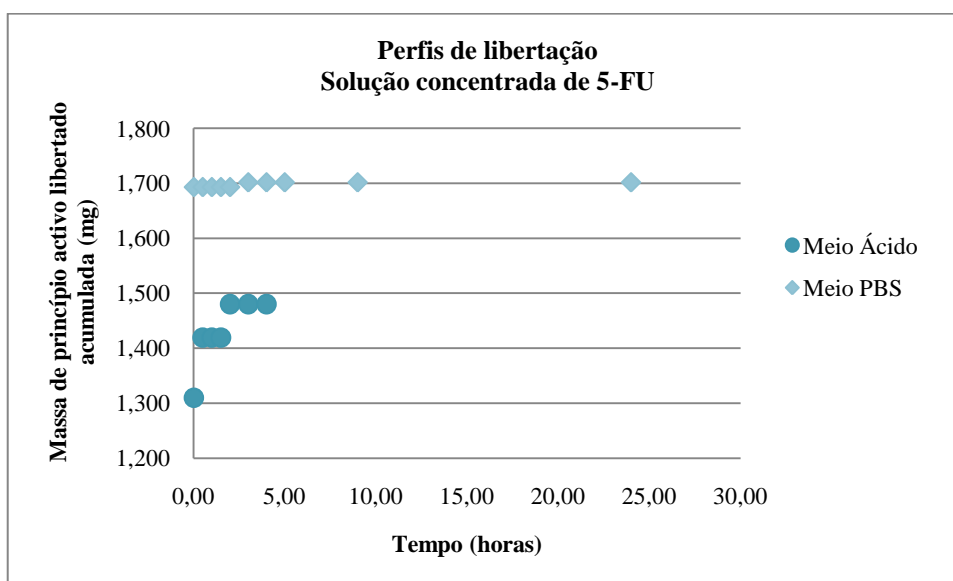


Figura 4. 36 - Perfis de libertação das macropartículas obtidas pela experiência 21 (Solução concentrada de 5-FU).

Na figura 4.36 encontram-se os perfis de libertação das macropartículas da experiência 21 (Solução concentrada com 5-FU). Estes perfis evidenciam uma libertação bastante rápida, sendo que em meio ácido esta cessa passada uma hora e meia e em meio PBS dá-se uma libertação inicial e só passadas duas horas volta a ocorrer libertação. A massa de 5-FU libertada em meio ácido é ligeiramente inferior à libertada em meio PBS.

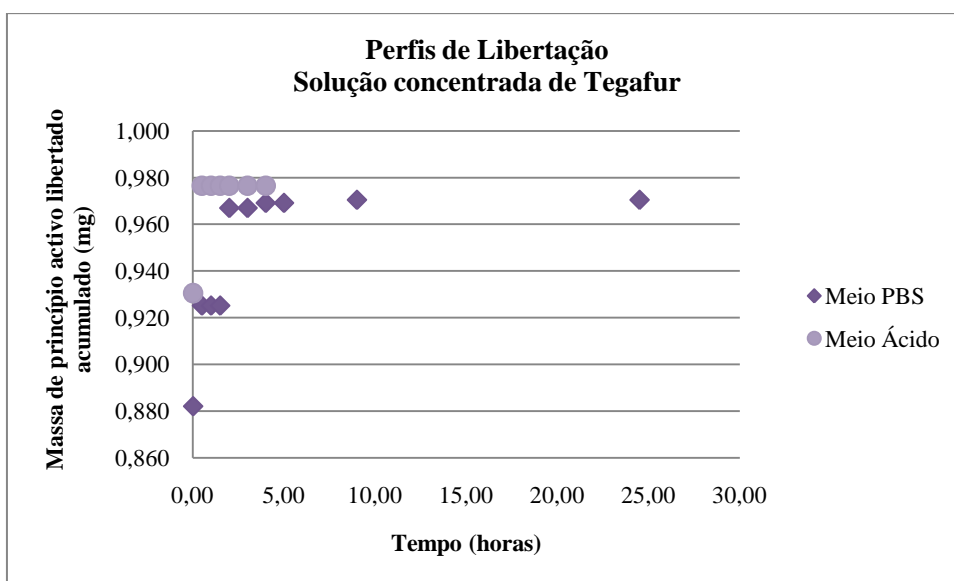


Figura 4. 37 -Perfis de libertação das macropartículas obtidas pela experiência 22 (Solução concentrada de Tegafur).

Na figura 4.37 estão presentes os perfis de libertação das macropartículas obtidas pela experiência 22 (Solução concentrada de Tegafur). Esta foi a experiência cujos resultados mais se afastaram dos objectivos previstos, uma vez que a massa de princípio activo libertada foi maior em meio ácido. Também se verificou uma massa de Tegafur libertada bastante reduzida, embora muito maior que a obtida pela experiência 8 do planeamento de experiências.

Todas as experiências mencionadas anteriormente deram origem a macropartículas cuja libertação foi bastante rápida. Alguns factores, que possam ter estado na origem destes resultados, são apresentados em seguida:

- Devido à grande hidrofiliabilidade das matrizes de polissacáridos, a libertação dos fármacos de reduzidos pesos moleculares, como o Tegafur e o 5-FU, destas estruturas é muito difícil de controlar, sendo esta bastante rápida, evidenciando uma libertação do tipo “explosão”.(George and Abraham, 2006; Arica *et al.*, 2002)
- A presença de fármaco na superfície das macropartículas, que não foi possível remover aquando da lavagem;
- Uma reticulação insuficiente, que permitiu uma absorção de moléculas de água, o que facilitou a difusão do 5-FU e Tegafur.

Também se verificou que as macropartículas contendo Tegafur apresentaram uma massa de fármaco libertada maior do que as micropartículas, evidenciando uma maior eficiência de encapsulação. Como já foi comprovado anteriormente, a remoção do passo do Ultra-Turrax resulta numa menor perda de fármaco.

Verificou-se em todos os perfis de libertação que não há uma protecção eficaz do princípio activo em meio ácido. Isto ocorre, provavelmente porque o volume de agente reticulante adicionado é insuficiente, permitindo a absorção de moléculas de água e, consequentemente, facilitando a difusão dos princípios activos em ambos os meios.

Comparando os dois métodos de incorporação de princípio activo utilizados, é possível concluir que o método de imersão das macropartículas numa solução concentrada do princípio activo é o melhor. Isto deve-se provavelmente ao facto de o princípio activo ser incorporado nas macropartículas já produzidas e liofilizadas, não passando pelas fases responsáveis pela perda do mesmo.

É possível observar uma maior libertação do 5-FU do que do Tegafur, evidenciando uma menor eficiência de encapsulação deste último. Cui-Yun Yu *et al.* produziram micropartículas de quitosano-alginato por este método, com 5-FU e Tegafur, tendo obtido uma maior eficiência de encapsulação para o 5-FU. Na origem destes resultados está o facto de o 5-FU ser menos solúvel em água do que o Tegafur.^[49]

5. Conclusões

Este trabalho teve como objectivos a produção e caracterização de micropartículas de polissacáridos contendo Tegafur e a realização de estudos de libertação em meio ácido e em meio básico.

5.1. *Micropartículas de EPS*

- **Método por emulsificação**

Foram produzidas micropartículas de EPS pelo método da emulsificação. As experiências com reticulação química realizada com a adição de divinilsulfona, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e poli(etileno glicol) diglicidil éter deram origem a aglomerados de polissacárido. Pode-se concluir que estes resultados se devem ao facto de o EPS ter uma grande capacidade de estabilizar emulsões, o que causa a sua grande agregação ao óleo, não originando micropartículas. Também se realizou a auto-reticulação com a adição de ácido sulfúrico concentrado, sendo que apenas esta originou micropartículas. Foi realizado um estudo de dissolução das micropartículas auto-reticuladas e os resultados demonstraram que estas mantêm a sua integridade em meio ácido, dissolvendo-se rapidamente em meio básico. Pode-se então concluir que a integridade das micropartículas em meio ácido se deve ao facto de se dar a auto-reticulação das micropartículas de EPS em meio ácido e a pouca integridade observada em meio PBS pH=7.4 se deve ao facto de as ligações de reticulação formadas não serem resistentes em pH neutro/básico.

- **Spray Drying**

Foram produzidas microesferas de EPS utilizando o Spray Dryer. No entanto obteve-se um rendimento de 19%, devido à acumulação de micropartículas nas paredes do ciclone e à sua difícil remoção. Como tal, este processo não é economicamente inviável mas, devido aos resultados obtidos, é um método a explorar.

- **Método por precipitação**

Realizou-se uma experiência de produção de micropartículas, fazendo-se precipitar gotas de uma solução de EPS numa solução 80/20 de acetona/água. No entanto, o polissacárido precipitou na forma de fibras.

5.2. *Micropartículas de Goma de Guar*

- **Spray Drying**

Foram produzidas microesferas de goma de guar utilizando o Spray Dryer. No entanto, o rendimento de micropartículas obtidas foi de 9,63%. Este valor baixo deve-se à acumulação destas nas paredes do ciclone e à sua difícil remoção. Como tal, este processo não vai ser utilizado, uma vez que é economicamente inviável. No entanto, é um processo a ser explorado, pelos resultados obtidos.

• Método por precipitação

Foi estudado o método de precipitação de gotas de solução aquosa de goma de guar e princípio activo numa solução 80/20 de acetona/água. Verificou-se que, inicialmente se formavam macropartículas e que, após a acção do Ultra-Turrax, se formam micropartículas porosas e de formas irregulares. Para a reticulação das micropartículas escolheu-se o glutaraldeído.

Para uma optimização do processo de produção de micropartículas, recorreu-se ao planeamento de experiências utilizando o método do composto central. As variáveis independentes estudadas foram a concentração da goma de guar, o volume de glutaraldeído e o tempo de reticulação. Devido aos resultados obtidos, não foi possível uma optimização do processo. Foi determinada a influência de cada uma das variáveis independentes em características das micropartículas como o tamanho, porosidade e grau de absorção de água.

• Efeito da concentração da goma de guar

Conclui-se que a concentração da solução inicial de goma de guar apenas afecta o tamanho das micropartículas caso seja demasiado elevada, uma vez que uma elevada viscosidade torna mais difícil a acção do Ultra-Turrax; ou reduzida, uma vez que a reduzida viscosidade resulta numa coalescência das gotas, formando um agregado polimérico, difícil de destruir pelo Ultra-Turrax. Não se verifica uma influência significativa nos tamanhos das micropartículas quando esta variável toma valores intermédios.

Pode-se igualmente concluir que a concentração da goma de guar afecta a porosidade das micropartículas, uma vez que com um aumento desta variável, há um maior número de cadeias poliméricas e consequentemente, um menor volume de espaços vazios nas micropartículas. Os resultados obtidos comprovaram esta influência da concentração da goma de guar na porosidade das micropartículas.

Esta variável também influencia o grau de absorção de água, uma vez que quanto maior esta for, maior será o número de grupos hidroxilo disponíveis para reacção e um maior volume de agente reticulante será necessário para uma reticulação eficaz. No entanto, isto só se verifica na comparação das experiências com 38 horas de reticulação, indicando que para tempos inferiores a este, a reacção de reticulação não é completa.

• Efeito do volume de agente reticulante adicionado

É possível concluir que o tamanho das micropartículas apenas é influenciado pelo volume de agente reticulante superior a 2.34 mL. Devido ao volume elevado de agente reticulante, há um maior número de ligações cruzadas formadas, o que origina uma diminuição do tamanho das micropartículas.

Não se verificaram variações significativas na porosidade das micropartículas por avaliação da superfície das mesmas. Seria de esperar uma diminuição na porosidade com o aumento do volume de glutaraldeído adicionado, por compactação das micropartículas. No entanto, podem ocorrer alterações que não são detectadas pela visão e por isso, recorreu-se à medição da área superficial interna das micropartículas. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que ocorre uma diminuição das dimensões dos poros com o aumento do volume de glutaraldeído, como o esperado, embora seja necessária uma análise complementar com porosímetro por intrusão de mercúrio, dada a natureza macroporosa das micropartículas.

Conclui-se que o volume de agente reticulante tem uma grande influência sobre o grau de absorção de água, uma vez que os resultados obtidos demonstraram que quanto maior for o volume de glutaraldeído adicionado, menor é a capacidade de absorção de água pelas micropartículas. Conclui-se também que a reacção de reticulação é mais eficaz para volumes de glutaraldeído superiores a 2,5 mL.

Os resultados obtidos demonstraram que os limites inferiores desta variável são demasiado reduzidos. As experiências 1, 2 e 5, com um volume de agente reticulante de 1 mL, deram origem a grandes agregados de polissacárido, indicando que este volume é insuficiente. Este facto foi comprovado pelo valor negativo do grau de absorção de água na experiência 14, cujo volume de glutaraldeído adicionado foi 0,66 mL, indicando a dissolução rápida das micropartículas em contacto com fluidos. Também a experiência 6, cujo volume de agente reticulante foi 1 mL, apresentou um grau de absorção de água demasiado reduzido, pela mesma razão apresentada anteriormente.

- **Efeito do tempo de reticulação**

Os resultados analisados demonstram que para tempos de reticulação muito reduzidos (como 27 minutos), as micropartículas adquirem maiores tamanhos. Isto pode ser explicado pelo facto de a reacção de reticulação ainda não ter ocorrido e, como tal, não houve uma compressão das micropartículas pelas ligações cruzadas. Para tempos acima de 10 horas, não se verificam alterações significativas nos tamanhos das micropartículas.

Tal como se verificou no efeito do volume de glutaraldeído, também o tempo de reticulação demonstrou não influenciar a porosidade das micropartículas. Seria de esperar que houvesse uma diminuição da porosidade com um aumento do tempo de reacção, uma vez que mais moléculas de glutaraldeído reagiriam e maior seria a compactação das micropartículas. Para se obterem resultados mais completos, seria necessário recorrer à análise da porosidade das micropartículas por porosímetro de mercúrio.

Verificou-se que esta variável influencia o grau de absorção de água, uma vez que, quanto mais tempo o glutaraldeído está em contacto com as micropartículas, mais completa será a reacção. É possível verificar uma diminuição no grau de absorção de água entre 24 e 47,5 horas, podendo-se concluir que os limites desta variável foram escolhidos incorrectamente. Este facto poderá ser comprovado pelas experiências 1 e 2, cujo tempo de reticulação foi de 10 horas, que originaram agregados de polissacárido. Também se verificou um grau de absorção de água negativo para a experiência 16, com um tempo de reticulação de 27 minutos, o que indica que a reticulação foi ineficaz, ocorrendo uma degradação rápida das micropartículas.

- **Isotérmicas obtidas por ASAP**

As isotérmicas de adsorção e dessorção obtidas por ASAP permitem concluir que as micropartículas apresentam um ciclo de histerese característico de agregados não rígidos de partículas em forma de placa, com poros em fenda.

- **Ensaio de libertação**

Verificou-se que a massa de princípio activo total libertado nos ensaios de libertação das micropartículas obtidas no planeamento de experiências foi baixa, dada a reduzida eficiência de encapsulação. Estudou-se a origem da perda do princípio activo no processo e concluiu-se que a mesma se dá maioritariamente entre a adição das gotas da solução de polissacárido e a acção do Ultra-Turrax, observando-se perdas também na acção do Ultra-Turrax e no processo de reticulação das micropartículas.

Para aumentar a eficiência de encapsulação, realizaram-se experiências com a introdução de macropartículas vazias numa solução concentrada do princípio activo, para o Tegafur e 5-FU, e também com a introdução do princípio activo na solução inicial do polissacárido, para o 5-FU.

Com estas alterações verificou-se um aumento na eficiência de encapsulação, pelo facto de se suprirem as etapas que causam a perda do princípio activo. No entanto esta ainda foi reduzida,

devendo-se ao facto de o 5-FU e o Tegafur terem reduzidos pesos moleculares e assim, haver perdas de fármaco para a solução aquosa.

Verificou-se que a libertação dos fármacos é bastante rápida, tanto em meio ácido como em meio básico e a libertação em meio ácido é elevada. Pode-se concluir que o volume de glutaraldeído adicionado é insuficiente, permitindo uma grande absorção de moléculas de água pelas macropartículas e facilitando a libertação dos princípios activos.

Também se verificou que há uma maior eficiência de encapsulação nas macropartículas com 5-FU do que nas macropartículas com Tegafur. Este facto deve-se à menor solubilidade do 5-FU em água, que resulta em menores perdas.

6. Trabalho futuro

Neste trabalho não foi possível otimizar o processo, por uma escolha incorrecta dos limites de duas das variáveis em estudo e obtiveram-se eficiências de encapsulação baixas.

Como tal, para se atingirem os objectivos propostos, é necessário prosseguir a investigação, realizando os seguintes passos:

- Otimização na utilização do “Spray Dryer”, de modo a se obter um aumento no rendimento, dado que por este método se obtiveram as melhores micropartículas. Caso isto seja possível, realizar o planeamento de experiências utilizando este método;
- Caso não seja possível aumentar o rendimento de micropartículas obtidas, redefinição dos limites do volume de agente reticulante e tempo de reticulação, para se poder realizar a optimização do processo de produção de micropartículas pelo método de precipitação. De acordo com os resultados obtidos, o limite mínimo para o volume de agente reticulante seria 3 mL e para o tempo de reticulação 38 horas;
- Realização do planeamento de experiências, caracterização das micropartículas formadas e posterior optimização no software Modde 8;
- Realização da incorporação do princípio activo pela imersão de micropartículas já produzidas em soluções concentradas do princípio activo. Com a adição de um maior volume de glutaraldeído, seria possível aumentar o tempo de contacto das micropartículas com a solução do fármaco, aumentando a eficiência de encapsulação.
- Produzir micropartículas com princípios activos menos solúveis em água e com maior peso molecular;
- Caracterizar as micropartículas obtidas em termos de porosidade por porosímetro de mercúrio;
- Além da realização em meio ácido e em meio neutro/básico, realizar ensaios de libertação em meio neutro/básico contendo enzimas galactomananase, responsáveis pela degradação da goma de guar no cólon.

7. Bibliografia

- [1] Kim, Kyekyoon “Kevin”, W. Pack, Daniel, *Microspheres for Drug Delivery*, University of Illinois at Urbana-Champaign;
- [2] Piskin, E., Hoffman, A. S., *Polymeric Biomaterials*, 1986;
- [3] Mainardes, Rubiana M., Silva, Luciano P., *Drug Delivery Systems: Past, Present, and Future, Current Drug Targets*, 2004, 5, 449-455;
- [4] Vaidya, Ankur, Jain, Aviral, Khare, Piush, Ram, K. Agrawal, Jain, Sanjay K., *Metronidazole Loaded Pectin Microspheres for Colon Targeting*, 2009;
- [5] Sinha, V. R., Mittal, B. R., Bhutani, K. K., Kumria, Rachna, *Colonic Drug Delivery of 5-Fluorouracil: an in Vitro Evaluation, International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 269, 101-108;
- [6] McConnel, Emma L., Tutas, Juned, Mohamed, Mohamed A. M., Banning, Douglas, Basit, Abdul W., *Colonic Drug Delivery using Amylose Films: The Role of Aqueous Ethylcellulose Dispersions in Controlling Drug Release*, 2007, *Cellulose*, 14:25-34;
- [7] Rahman, Ziyaur, Kohli, Kanchan, Khar, Roop K., Ali, Mushir, Charoo, Naseem A., Shamsheer, Areeg A. A., *Characterization of 5-Fluorouracil Microspheres for Colonic Delivery*, 2006, *AAPS PharmSciTech*, 7 (2) Article 47;
- [8] Paharia, Amol, Yadav, Awesh K., Rai, Gopal, Jain, Sunil K., Pancholi, Shyam S., Agrawal, Govind P., *Eudragit-Coated Pectin Microspheres of 5-Fluorouracil for Colon Targeting*, 2007, *AAPS PharmSciTech*, 8 (1) Article 12;
- [9] Brito, Rogelio A., Medgyesy, Diana, Zukowski, Thomas H., Royce, Melanie E., Ravandi-Kashani, Farhad, Hoff, Paulo M., Pazdur, Richard, *Fluoropyrimidines: A Critical Evaluation*, 1999, *Oncology*, 57(suppl 1):2-8;
- [10] Philip, Anil K., Philip, Betty, *Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches*, 2010, *OMJ*, 25: 70-78;
- [11] Kinget, Renaat, Kalala, Willbrord, Vervoort, Liesbeth, Van den Mooter, Guy, *Colonic Drug Targeting: a Review Article*, 1998, *Journal of Drug Targeting*, Vol. 6, No. 2, pp. 129-149;
- [12] *Cancro Colo-Rectal no Portal de oncologia português (consultado em 01.11.2010), disponível online em www.pop.eu.com*;
- [13] Chaurasia, Mohini, Chourasia, Manish K., Jain, Nitin K., Jain, Aviral, Soni, Vandana, Gupta, Yashwant, Jain, Sanjay K., *Cross-Linked Guar Gum Microspheres: A Viable Approach for Improved Delivery of Anticancer Drugs for the Treatment of Colorectal Cancer*, 2006, *AAPS PharmSciTech*, 7 (3) Article 74,
- [14] Koning, Gerben A., Kamps, Jan A. A. M., Scherphof, Gerrit L., *Efficient Intracellular Delivery of 5-Fluorodeoxyuridine into Colon Cancer Cells by Targeted Immunoliposomes*, 2002, *Cancer Detection and Prevention*, 26, 299-307;
- [15] Programa *Globocan* (consultado em 04.11.2010), disponível online em globocan.iarc.fr;
- [16] Benita, Simon, *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*, Second Edition, 2006;
- [17] Siepmann, Juergen, Siepmann, Florence, *Microparticles Used as Drug Delivery Systems*, 2006, *Progr Colloid Polym Sci*, 133: 15-21;
- [18] Smith, Kelly L., Herbig, Scott M., *Controlled Release*;
- [19] *Drug Delivery, acetatos da disciplina de biomateriais, curso de medicina dentária da Universidade Católica Portuguesa, (consultado em 05.11.2010), disponível online em molar.crb.ucp.pt/*

- [20] Mansour, Heidi M., Sohn, MinJi, Al-Ghananeem, Abeer, DeLuca, Patrick, Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects, 2010, Int. J. Mol. Sci., 11, 3298-3322;
- [21] Pillai, Omathanu, Panchagnula, Ramesh, Polymers in Drug Delivery, 2001, Current opinion in chemical biology, 5: 447-451;
- [22] Asghar, Laila F. A., Chure, B. Chetan, Chandran, Sajeev, Colon Specific Delivery of Indomethacin: Effect of Incorporating pH Sensitive Polymers in Xantham Gum Matrix Bases, 2009, AAPS PharmSciTech, Vol. 10, No 2;
- [23] Zhou, Siyuan, Zhang, Bangle, Liu, Xinyou, Teng, Zenghui, Huan, Menglei, Yang, Tiehong, Yang, Zhifu, Jia, Min, Mei, Qibing, A New Natural Angelica Polysaccharide Based Colon-Specific Drug Delivery System, 2009;
- [24] Jain, Anekant, Gupta, Yashwant, Jain, K. Sanjay, Potencial of Calcium Pectinate Beads for Target Specific Drug Release to Colon, 2007, Journal of Drug Targeting, 15 (4): 285-294;
- [25] Park, Hyun-Sun, Lee, Jue-Yeon, Cho, Sun-Hye, Baek, Hyon-Jin, Lee, Seung-Jin, Colon Delivery of Prednisolone Based on Chitosan Coated Polysaccharide Tablets, 2002, Arch. Pharm. Res., Vol 25, No 6, 964-968;
- [26] RC, Jat, Suman, Jain, Subodh, Dubey, Vinay, Jain, Sudhir, Bhardwaj, Amit, Jain, Preparation and Evaluation of Colon Targeting Microspheres, 2010, Journal of Pharmacy Research, 3 (3), 596-599;
- [27] Kosaraju, Shantha L., Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery, 2005, Critical reviews in food science and nutrition, 45:251-258;
- [28] Pinto, João F., Site-Specific Drug Delivery Systems Within the Gastro-Intestinal Tract: From the Mouth to the Colon, 2010, International Journal of Pharmaceutics 395: 44-52;
- [29] Yehia, Soad A., Elshafeey, Ahmed H., Sayed, Ibrahim, Shehata, Ahmed H., Optimization of Budesonide Compression-Coated Tablets for Colonic Delivery, 2009, AAPS PharmSciTech, Vol. 10, No 1;
- [30] Rasheed, A., Kumar, C. K. A., Novel Approaches on Prodrug Based Drug Desing, 2008, Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 42, No 12;
- [31] Perera, Glen, Barthelmes, Jan, Bernkop-Schnürch, Andreas, Novel Pectin-4-Aminothiophenole Conjugate Microparticles for Colon-Specific Drug Delivery, 2010, Journal of Controlled Release, 145, 240-246;
- [32] Siew, Lee F., Basil, Abdul W., Newton, J. Michael, The Potencial of Organic-Based Amylose-Ethylcellulose Film Coatings as Oral Colon-Specific Drug Delivery Systems, 2000, AAPS PharmSciTech, 1 (3) article 22;
- [33] Dodov, M. Glavas, Calis, S., Crcarevska, M. S., Geskovski, N., Petrovska, V., Goracinova, K., Wheat Germ Agglutinin-Conjugated Chitosan-Ca-Alginate Microparticles for Local Colon Delivery of 5-FU: Development and *In Vitro* Characterization, 2009, International Journal of Pharmaceutics, 381, 166-175;
- [34] Kumar, Manoj, Ali, Akabar, Kaldhone, Prashant, Shirode, Abhay, Kadam, Vilasrao J., Platform Technologies for Colon Targeted Drug Delivery System: A Review Article, 2010, Journal of Pharmacy Research, 3 (3), 543-547;
- [35] Ganji, Fariba, Vasheghami-Farahani, Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems, 2009, Iranian Polymer Journal, 18 (1), 63-88;
- [36] Chourasia, M. K., Jain, S. K., Polysaccharides for Colon Targeted Drug Delivery, 2004, Drug Delivery, 11, 129-148;

- [37] Huang, Liangliang, Sui, Weiping, Wang, Yuanxiu, Jiao, Qiang, Preparation of Chitosan/Chondroitin Sulfate Complex Microcapsules and Application in Controlled Release of 5-FU, 2010, Carbohydrate Polymers, 80, 168-173;
- [38] Freitas, Filomena, Alves, Vítor D., Torres, Cristiana A. V., Cruz, Madalena, Sousa, Isabel, Melo, Maria João, Ramos, Ana M., Reis, Maria A. M., Fucose-Containing Exopolysaccharide Produced by the Newly Isolated *Enterobacter* Strain A47 DSM 23139, 2010, Carbohydrate Polymers, Article in Press;
- [39] Guar Gum (consultado em 03.12.2010), disponível online em www.guargum.biz;
- [40] Guar Gum (consultado em 03.12.2010), disponível online em www.hbgum.com;
- [41] Valentine, Peter J., Salyers, Abigail A., Analysis of Proteins Associated with Growth of *Bacteroides Ovatius* on the Branched Galactomannan Guar Gum, 1992, Applied and Environmental Microbiology, p. 1534-1540;
- [42] Krishnaiah, Y. S. R., Satyanarayana, V., Kumar, B. Dinesh, Karthikeyan, In Vitro Drug Release Studies on Guar Gum-Based Colon Targeted Oral Drug Delivery Systems of 5-Fluorouracil, 2002, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 16, 185-192;
- [43] Krishnaiah, Y. S. R., Karthikeyan, R. S., Satyanarayana, V., A Three-Layer Guar Gum Matrix Tablet for Oral Controlled Delivery of Highly Soluble Metoprolol Tartrate, 2002, International Journal of Pharmaceutics, 241, 353-366;
- [44] Al-Saidan, Saleh M., Krishnaiah, Yellela S. R., Patro, Srinivas S., Satyanarayana, Vemulapalli, In Vitro and In Vivo Evaluation of Guar Gum Matrix Tablets for Oral Controlled Release of Water-Soluble Diltiazem Hydrochloride, 2005, AAPS PharmSciTech, 6 (1) Article 5;
- [45] Collins, Maurice N., Birkinshaw, Colin, Investigation of the Swelling Behavior of Crosslinked Hyaluronic Acid Films and Hydrogels Produced Using Homogeneous Reactions, 2008, Wiley InterScience;
- [46] Collins, M. N., Birkinshaw, C., Comparison of the Effectiveness of Four Different Crosslinking Agents With Hyaluronic Acid Hydrogel Films for Tissue-Culture Applications, 2007, Wiley InterScience;
- [47] Khare, Piush, Jain, Sanjay K., Influence of Rheology of Dispersion Media in the Preparation of Polymeric Microspheres Through Emulsification Method, 2009, AAPS PharmSciTech, Vol. 10, No 4;
- [48] Yeo, Yoon, Baek, Namjin, Park, Kinam, Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs, 2001, Biotechnol. Bioeng., 6, 213-230;
- [49] Yu, Cui-Yun, Zhang, Xi-Chen, Zhou, Fang-Zhou, Zhang, Xian-Zheng, Cheng, Si Xue, Zhuo, Ren-Xi, Sustained Release of Antineoplastic Drugs From Chitosan-Reinforced Alginate Microparticle Drug Delivery Systems, 2008, International Journal of Pharmaceutics, 357, 15-21;
- [50] Jyothi, N. Venkata Naga, Prasanna, Muthu, Prabha, Surya, Ramaiah, P. Seetha, Srawan, G., Sakarkar, S. N., Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency: A Review, 2009, Internet Journal of Nanotechnology 2009, Vol. 3 Issue 1, p5-5;
- [51] Freitas, Sergio, Merkle, Hans P., Gander, Bruno, Microencapsulation by Solvent Extraction/Evaporation: Reviewing the State of the Art of Microsphere Preparation Process Technology, 2005, Journal of Controlled Release, 102, 313-332;
- [52] Lin, Chien-Chi, Metters, Andrew T., Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling, 2006, Advanced Drug Delivery Reviews, 58, 1379 – 1408;
- [53] Lamont, Elizabeth B., Schilsky, Richard L., The Oral Fluoropyrimidines in Cancer Chemotherapy, 1999, Clinical Cancer Research, Vol. 5, 2289 – 2296;

- [54] Breda, Massimo, Barattè, Simona, A Review of Analytical Methods for the Determination of 5-Fluorouracil in Biological Matrices, 2010, *Anal Bioanal Chem*, 397, 1191 – 1201;
- [55] Calvo, Felipe A., Aldaz, Azucena, Zufía, Laura, De la Mata, Dolores, Javier Serrano, García, Rafael, Arranz, José A., Alvarado, Arnaldo, Giráldez, Joaquín, Tegafur and 5-Fluorouracil Pelvic Tissue Concentrations in Rectal Cancer Patients Receiving Preoperative Chemoradiation, 2006, *Clin. Transl. Oncol.*, 8 (7), 500 – 507;
- [56] Parikh, Rajesh H., Parikh, Jolly R., Dubey, Rajesh R., Soni, Heena N., Kapadia, Kishor N., Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres Containing 5-Fluorouracil: Optimization of Process Parameters, 2003, *AAPS PharmSciTech*, 4 (2), Article 13;
- [57] Royce, Melanie E., Hoff, Paulo M., Padzur, Richard, Novel Chemotherapy Agents for Colorectal Cancer: Oral Fluoropyrimidines, Oxaliplatin, and Raltitrexed, 1999, *Current Oncology Reports*, 1, 161 – 167;
- [58] Fonseca, Jussara Teresa Vieira, *Quimioterapia: Guia de Assistência Prática ao Paciente*, Editora Edipucrs;
- [59] Lundstedt, Torbjörn, Seifert, Elisabeth, Abramo, Lisbeth, Thelin, Bernt, Nyström, Asa, Pettersen, Jarle, Bergman, Rolf, *Experimental Design and Optimization*, 1998, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42, 3-40;
- [60] Dilts, Robert V., *Cromatografia de Partição, acetatos da disciplina de Química Analítica, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa* (consultado em 10.01.2011), disponível online em www.dq.fct.unl.pt;
- [61] Gliko-Kabir, Irit, Yagen, Boris, Penhasi, Adel, Rubinstein, Abraham, Low Swelling, Crosslinked Guar and its Potential Use as Colon-Specific Drug Carrier, 1998, *Pharmaceutical Research*, Vol. 15, No. 7;
- [62] *Espectroscopia de Infravermelho, acetatos da disciplina de práticas laboratoriais de diagnóstico e teoria do restauro I, Universidade de Lisboa*, (consultado em 05.02.2011), disponível online em www.ciul.ul.pt;
- [63] Rath, R. K., Subramanian, S., Pradeep, T., Surface Chemical Studies on Pyrite in the Presence of Polysaccharide-Based Flotation Depressants, 2000, *Journal of Colloid and Interface Science*, 229, 82–91;
- [64] Rath, R. K., Subramanian, S., Sivanandam, V., Pradeep, T., Studies on the Interaction of Guar Gum With Chalcopyrite, 2001, *Canadian Metallurgical Quarterly*, Vol. 40, No. 1, pp. 01-12;
- [65] Prasad, Onkar, Sinha, Leena, Kumar, Naveen, Theoretical Raman and IR Spectra of Tegafur and Comparison of Molecular Electrostatic Potential Surfaces, Polarizability and Hyperpolarizability of Tegafur With 5-Fluoro-Uracil by Density Functional Theory, 2010, *J. At. Mol. Sci.*, Vol. 1, No. 3, pp. 201-214;
- [66] Kumar, Shukla Raj, Piyush, Trivedi, Suman, Ramteke, Akanksha Tiwari, Preparation and Characterization of Cross-Linked Guar Gum Microspheres: Optimization Using Factorial Design, Research Paper;
- [67] Figueiredo, José Luís, Ribeiro, Fernando Ramôa, *Catálise Heterogênea*, 2007, Fundação Calouste Gulbenkian.